



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

THIAGO DE OLIVEIRA FERRÃO

**USO DA DOPPLERFLUXOMETRIA ARTERIAL
RENAL, PERIFÉRICA E ORBITAL EM JOVENS
PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME:
ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE
HEMÓLISE**

**ARACAJU
2015**

THIAGO DE OLIVEIRA FERRÃO

**USO DA DOPPLERFLUXOMETRIA ARTERIAL
RENAL, PERIFÉRICA E ORBITAL EM JOVENS
PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME:
ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE
HEMÓLISE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à conclusão do curso de
Doutorado em Ciências da Saúde.

Orientadora: _____
Prof.^a Dr.^a Rosana Cipolotti

**ARACAJU
2015**

TERMO DE APROVAÇÃO

Aos que buscam conhecimento
com afino e discernimento,
sem olvidar a Sabedoria
que do alto nos ilumina,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus Todo-Poderoso, Pai de infinita bondade e misericórdia, pela vida, pela saúde, pelas lutas e vitórias diuturnas.

À minha família, em especial meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional e carinho incessante.

À minha querida esposa, Elaine, pela compreensão, pelo suporte e pelo afeto, e ao meu pequeno Henrique, fruto de nosso amor e razão de nossas alegrias, que perpetuará nossa essência.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Rosana Cipolotti, verdadeira amiga e mentora, sempre prestativa e paciente, pela histórica jornada acadêmica trilhada juntos em diversas instâncias, desde os primórdios como aluno de iniciação científica, percorrendo a monografia da Graduação, a seleção pública ao Magistério Superior, a dissertação do Mestrado e até os dias de hoje, e que certamente perdurará *ad aeternum*.

Ao Corpo Docente do curso de Doutorado em Ciências da Saúde do Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe, por compartilhar suas experiências e apontar os melhores caminhos.

Aos colegas do curso de Doutorado, pela rica convivência.

Ao Laboratório Central do Hospital Universitário, na pessoa de Flávia e de Paulo Herlan, pela indispensável colaboração e ágil atuação na coleta e processamento das amostras.

Ao caro colega Prof. Dr. Hyder, pela cooperação imane e solidária no planejamento e na aquisição de dados.

Aos recém-colegas Marlyson, Cleverton, Leonardo, Allan, Demétrius e outros tantos, pela dedicação e pela disponibilidade integral na operacionalização da pesquisa.

Ao grande amigo Paulo Ricardo, pelas ideias originais, pelas sugestões precisas na formatação final dos artigos e pela brilhante contribuição na estatística dos resultados.

Aos pacientes, voluntários e familiares, pela participação imprescindível e por tornarem possível a execução deste trabalho.

Aos funcionários do Hospital Universitário, pelo empenho e auxílio logístico.

A todos quantos direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste opúsculo.

Wissenschaft ist organisiertes Wissen.
Weisheit ist organisiertes Leben.
(Ciência é conhecimento organizado.
Sabedoria é vida organizada).
Immanuel Kant

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 JUSTIFICATIVA.....	05
3 OBJETIVOS.....	06
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	07
4.1 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO.....	07
4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	07
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	07
4.4 CASUÍSTICA.....	08
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	10
4.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	10
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
5.1 ARTIGO 1.....	11
5.2 ARTIGO 2.....	27
5.3 ARTIGO 3.....	39
5.4 DISCUSSÃO GERAL.....	61
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVCI	– acidente vascular cerebral isquêmico
BI	– bilirrubina indireta
BT	– bilirrubina total
CHCM	– concentração de hemoglobina corpuscular média
cm/s	– centímetro por segundo
DHL	– desidrogenase láctica
fL	– femtolitro
g/dL	– grama por decilitro
GE	– General Electric
Hb	– hemoglobina
HbA	– hemoglobina A
HbC	– hemoglobina C
HbD	– hemoglobina D
HbS	– hemoglobina S
HCM	– hemoglobina corpuscular média
Hm	– hemácia
Ht	– hematócrito
HU	– Hospital Universitário
IP	– índice de pulsatilidade
IR	– índice de resistência
kHz	– kilohertz
mg/dL	– miligrama por decilitro
MHz	– megahertz
NO	– óxido nítrico
pg	– picograma
Ret	– reticulócito
SC	– dupla heterozigose
SS	– homozigose
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFS	– Universidade Federal de Sergipe
U/L	– unidades por litro
USA	– United States of America

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VCM	– volume corpuscular médio
VDF	– velocidade diastólica final
Vm	– velocidade média
VPS	– velocidade de pico sistólico
WI	– Wisconsin

LISTA DE SÍMBOLOS

α	– alfa
β	– beta
η	– eta
μ	– mi
μL	– microlitro
π	– pi
σ	– sigma

RESUMO

Anemia falciforme (AF), forma homozigótica da doença falciforme, é uma das hemoglobinopatias hereditárias mais comuns, caracterizada pela produção de hemoglobina anormal (HbS) que, no estado desoxigenado, deforma e enrijece as hemácias, promovendo manifestações multissistêmicas. As complicações clínicas podem ser agrupadas em dois subfenótipos: vasculopatia e viscosidade-vaso-oclusão. A vasculopatia está associada à intensidade da hemólise e contribui para a disfunção crônica de diversos órgãos, com a participação do endotélio. A disfunção endotelial está associada a marcadores laboratoriais de hemólise (hemoglobina, contagem de reticulócitos, desidrogenase láctica e bilirrubinas) e pode manifestar-se como reatividade vascular anormal em estudos de fluxo sanguíneo visceral, periférico e central, avaliado por ultrassonografia Doppler. O objetivo deste trabalho foi investigar o estado de resistência vascular arterial nos rins, membros inferiores e órbitas por meio de dopplervelocimetria em portadores de AF, e sua relação com biomarcadores de hemólise. Dois grupos foram examinados neste estudo transversal. Um grupo consistiu de 71 pacientes portadores de AF; o outro, controle, formado por 32 sujeitos saudáveis, pareados por gênero e idade. Todos os participantes foram avaliados por meio de ultrassonografia Doppler e de testes laboratoriais. Todos os biomarcadores foram anormais nos portadores de AF em comparação aos controles ($p < 0,0001$). A avaliação dopplerfluxométrica evidenciou velocidades alteradas e índices de resistência vascular IR (índice de resistência) e IP (índice de pulsatilidade) elevados no grupo AF em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). A análise da relação entre os marcadores de hemólise e os índices de resistência vascular mostrou associação significativa. Nos rins, forte correlação inversa foi observada entre nível de hemoglobina e IR e IP em todas as artérias; moderada correlação direta foi encontrada entre desidrogenase láctica e os índices de resistência nas artérias segmentares. Nos membros inferiores, moderada correlação direta foi detectada entre contagem de reticulócitos e velocidade de pico sistólico nas artérias tibial anterior e tibial posterior; forte correlação inversa foi observada entre hemoglobina e velocidade de pico sistólico em todas as artérias. Nas órbitas, moderada correlação direta foi encontrada entre contagem de reticulócitos e os índices de resistência na artéria oftálmica; e forte correlação inversa foi detectada entre hemoglobina e IR e IP na artéria central da retina. O trabalho demonstrou que a resistência vascular arterial dos rins, membros inferiores e órbitas, aferida por meio de dopplervelocimetria, é elevada em portadores de AF, com moderada a forte correlação com os biomarcadores de hemólise.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Ultrassonografia Doppler de Pulso; Rim; Extremidade Inferior; Órbita; Hemólise; Marcadores Biológicos.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA), homozygous form of sickle cell disease, is the most common hereditary hemoglobinopathy, characterized by the production of abnormal hemoglobin (HbS) which, in deoxygenated state, deforms and hardens the red cells with multisystemic manifestations. The clinical complications can be grouped in two subphenotypes: vasculopathy and viscosity-vaso-occlusion. Vasculopathy is associated to hemolysis intensity and contributes to chronic dysfunction of several organs, with endothelial participation. Endothelial dysfunction is associated to hemolysis laboratory markers (hemoglobin level, reticulocyte count, lactate dehydrogenase and bilirubin levels) and can manifest as abnormal vascular reactivity in visceral, peripheral and central blood flow studies, assessed by Doppler ultrasound. The aim of this study was to investigate the arterial vascular resistance state in the kidneys, lower limbs and orbits by means of dopplervelocimetry in SCA patients, and its relationship with hemolysis biomarkers. Two groups were examined in this cross-sectional study. One group consisted of 71 outpatients with SCA; the other group was a control group, consisting of 32 age- and sex-matched, apparently healthy subjects. All participants were assessed by means of Doppler ultrasound and laboratory tests. All biomarkers were abnormal in the SCA patients compared with the control subjects ($p < 0.0001$). Doppler sonography evaluation revealed altered velocities and elevated resistance indices RI (resistive index) and PI (pulsatility index) in SCA group compared to control group ($p < 0.0001$). The relationship analysis between hemolysis biomarkers and vascular resistance indices showed significant association. In the kidneys, strong inverse correlation was observed between hemoglobin level and RI and PI in all arteries; moderate direct correlation was detected between lactate dehydrogenase and the resistance indices in segmental arteries. In the lower limbs, moderate direct correlation was observed between reticulocyte count and peak systolic velocity (PSV) in the anterior tibial and posterior tibial arteries; strong inverse correlation was detected between hemoglobin and PSV in all arteries. In orbits, moderate direct correlation was found between reticulocyte count and resistance indices in ophthalmic artery; and strong inverse correlation was observed between hemoglobin and RI and PI in the central retinal artery. This research demonstrated that arterial vascular resistance in the kidneys, lower limbs and orbits, assessed by means of Doppler ultrasound, is elevated in SCA patients, and shows moderate to strong correlation with hemolysis biomarkers.

Keywords: Anemia, Sickle Cell; Ultrasonography, Doppler, Pulsed; Kidney; Lower Extremity; Orbit; Hemolysis; Biological Markers.

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é uma doença genética caracterizada por mutação pontual no sexto códon do gene da cadeia β da hemoglobina A, localizado no cromossomo 11, decorrente da substituição do ácido glutâmico pela valina. Essa substituição resulta na produção de uma hemoglobina anormal, a HbS, que, por sua vez, é responsável por alterações nos eritrócitos que culminam em obstrução da microcirculação, isquemia, necrose tecidual e disfunção de órgãos (BITARÃES, 2008; LOUREIRO, 2008).

A denominação anemia falciforme é reservada para a forma que ocorre nos indivíduos homozigotos para a hemoglobina S (SS), havendo ainda as formas heterozigotas, nas quais o gene da HbS combina-se com a hemoglobina normal (HbA) ou com outras formas anormais da hemoglobina (HbC, HbD, betatalassemia, entre outras) (YANAGUIZAWA, 2008).

Estima-se que existam mais de 2 milhões de portadores da HbS no Brasil, sendo mais de 8 mil portadores de anemia falciforme, ocorrendo, predominantemente, entre afrodescendentes. Estima-se, também, o nascimento de 700 a 1.000 novos casos por ano de crianças com doenças falciformes (RUIZ, 2007; YANAGUIZAWA, 2008).

As manifestações clínicas das doenças falciformes derivam diretamente da anormalidade molecular representada pela presença da HbS. As moléculas de HbS, quando desoxigenadas, se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez se associam em feixes com um duplo filamento central rodeado de seis filamentos duplos de polímeros. Esses feixes determinam deformações das células. A deformação mais conhecida é uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada”, embora as hemácias anormais possam assumir um amplo espectro de alterações morfológicas.

Essas modificações têm consequências que as amplificam, levando às manifestações clínicas: a) provocam aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios que influenciam também os granulócitos e plaquetas; b) enrijecem a membrana e toda a hemácia, encurtando sua sobrevida em circulação; c) provocam lesões microvasculares; d) causam depleção de óxido nítrico (NO) que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação; e) ativam a coagulação (ZAGO, 2007).

As complicações clínicas podem ser agrupadas em dois subfenótipos distintos: vasculopatia, que envolve hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de perna e acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI); e viscosidade-vaso-oclusão, composta de crises dolorosas, síndrome torácica aguda e osteonecrose. A vasculopatia está associada à

intensidade da hemólise e contribui para a disfunção crônica de diversos órgãos, como os rins (KATO, 2007; KATO, 2009).

O endotélio normal regula diversas funções biológicas, que incluem atividade hormonal autócrina, parácrina e endócrina; balanço pró- *versus* anticoagulante; fluxo e pressão sanguínea; permeabilidade vascular; sinalização inflamatória mediante moléculas de adesão; e síntese de óxido nítrico. Cada um destes papéis fisiológicos é afetado no contexto da anemia falciforme (KATO, 2009).

O óxido nítrico (NO) regula o tônus vasodilatador basal e inibe plaquetas, a ativação hemostática e a expressão de moléculas de adesão. Na doença falciforme, a hemólise intravascular libera oxiemoglobina no plasma, que reage com NO produzindo nitrato bioinativo e metemoglobina; libera também arginase-1, que interfere na síntese de NO, através da conversão da arginina plasmática (precursora do NO) em ornitina; hemoglobina, heme e ferro livres, oriundos de hemácias rompidas, catalisam a produção de radicais livres de oxigênio, que limitam a bioatividade do NO. Desse modo, a depleção crônica e a redução da biodisponibilidade do NO, provocadas pela hemólise, contribuem para vasoconstrição, vasculopatia proliferativa, ativação de plaquetas e de moléculas de adesão endotelial, e produção de endotelina, potente vasoconstritor e mitógeno (KATO, 2007; KATO, 2009).

Esplenectomia é outro fator associado à vasculopatia. De causa cirúrgica ou funcional, a esplenectomia remove grande parte do sistema reticuloendotelial, o que desvia a hemólise do compartimento extravascular para o intravascular, liberando mais hemoglobina no plasma e aumentando a depleção de NO, com efeito vasoconstritor e protrombótico (KATO, 2007).

A vasculopatia da anemia falciforme pode ser avaliada de modos distintos. A disfunção endotelial está associada a marcadores laboratoriais de hemólise, como hemoglobina sérica, desidrogenase láctica, bilirrubinas e contagem de reticulócitos. A mesma disfunção pode manifestar-se como reatividade vascular anormal em estudos de fluxo sanguíneo periférico, visceral e central, avaliado mediante ultrassonografia com dopplervelocimetria (KATO, 2007; KATO, 2009; KREJZA, 2011; TAORI, 2008; ZAWAR, 2005).

Ultrassonografia é um método de diagnóstico por imagem que utiliza ondas mecânicas (sons) com frequência acima de 20 kHz, emitidas por um dispositivo denominado transdutor, que interagem com estruturas orgânicas formando ecos, os quais são captados pelo mesmo transdutor e são processados por sistema computadorizado específico, formando imagens com informações anatômicas e morfoestruturais da região insonada. Para a análise de partículas em movimento, como ocorre no fluxo sanguíneo, utiliza-se o recurso denominado dopplervelocimetria ou dopplerfluxometria, com base no fenômeno acústico descrito pelo

físico austríaco Hans Christian Doppler, em 1842. A ultrassonografia com dopplerfluxometria avalia a morfologia vascular e o comportamento hemodinâmico arterial e venoso, fornecendo dados sobre direção e velocidade de fluxo, resistência, fasicidade, variação sístole-diástole, dentre outros, através dos modos colorido e pulsado/espectral (ZWIEBEL, 2005).

Segundo a Lei de Poiseuille, expressa pela equação:

$$Q = \frac{\pi(P_1 - P_2)r^4}{8L\eta}$$

onde Q é o volume de fluxo; P_1 e P_2 são as pressões nas extremidades proximal e distal do tubo, respectivamente; r e L são o raio e o comprimento do tubo, respectivamente; e η a viscosidade do fluido; observa-se que pequenas modificações no raio interno dos vasos trazem grandes mudanças no fluxo sanguíneo, proporcional à quarta potência desse raio, e por consequência na resistência vascular, conforme a Lei de Ohm (fluxo e resistência são inversamente proporcionais). No caso da doença falciforme, em que vasoconstrição e vasculopatia proliferativa reduzem o lúmen vascular arterial, utiliza-se ultrassonografia com Doppler com o intuito de detectar alterações na velocidade e na resistência do fluxo (ZWIEBEL, 2005).

Uma das respostas fisiológicas à anemia é o aumento do débito cardíaco. O débito cardíaco eleva-se na anemia normovolêmica; a magnitude desse aumento está intimamente relacionada à redução da viscosidade sanguínea. A diminuição da viscosidade sanguínea reduz a resistência ao fluxo sanguíneo, e consequentemente eleva o retorno venoso e facilita o esvaziamento ventricular esquerdo por diminuição da pós-carga. Ativação simpática também pode ocorrer, elevando a frequência cardíaca com ou sem o incremento na contratilidade miocárdica; entretanto, em condições normovolêmicas, estas mudanças exercem um papel menor na elevação do débito cardíaco (MCLELLAN, 2004). Anemia falciforme representa uma aberração nas propriedades reológicas do sangue causada pela perda da deformidade normal da hemácia. Os valores caracteristicamente baixos do hematócrito compensam a rigidez das células falcêmicas; assim, a viscosidade sanguínea global permanece inalterada (HORNE III, 1981). Estudo recente mostrou relação positiva e significativa entre o nível de hemoglobina e a viscosidade do sangue (CONNES, 2014). Uma discussão detalhada sobre viscosidade sanguínea e hemorreologia está além do escopo deste trabalho.

Diversos trabalhos descrevem alterações vasculares em portadores de doença falciforme, com o uso de ultrassonografia com Doppler. Os territórios cerebral (Doppler transcraniano), arterial pulmonar (ecocardiografia transtorácica), renal e periférico são os mais estudados (AIKIMBAEV, 1998; GUVENC, 2005; HOKAZONO, 2011; KATO, 2009;

KREJZA, 2011; KUZMIĆ, 2000; MINNITI, 2010; TAORI, 2008; ZAWAR, 2005). Outro sítio de interesse são as órbitas, frequentemente acometidas por retinopatia, que traduz envolvimento vaso-oclusivo da microcirculação (AIKIMBAEV, 2001). A avaliação vascular orbitária, através das artérias oftálmica e central da retina, é acessível e reprodutível e é campo aberto para questões de pesquisa (DINIZ, 2004). Diversas investigações sobre fluxo arterial orbitário são possíveis: se há relação com o subfenótipo vasculopatia; se existe associação com marcadores laboratoriais de hemólise; se há correlação dopplervelocimétrica com outros territórios vasculares. Investigações semelhantes foram conduzidas nos âmbitos cerebrovascular e arterial pulmonar (KATO, 2006), mas pouco se conhece das relações dos territórios orbitário, renal e periférico entre si, e destes com vasculopatia falciforme.

Consideramos a hipótese de que o estudo vascular arterial das órbitas, rins e membros inferiores por ultrassonografia Doppler, em portadores de anemia falciforme, apresenta associação com marcadores clínico-laboratoriais relevantes no controle dessa doença.

2 JUSTIFICATIVA

A ultrassonografia com Doppler é um método não ionizante, de baixo custo, amplamente disponível nos serviços de diagnóstico por imagem, acessível à população e com muitas aplicações na prática clínica.

As artérias oftálmica e central da retina são vasos plenamente acessíveis ao estudo dopplervelocimétrico, com protocolo simples e facilmente reproduzível, e refletem de modo satisfatório a hemodinâmica cerebrovascular.

O estudo dopplerfluxométrico arterial das órbitas, complementado com a avaliação dos leitos renal e periférico, permite a análise da saúde vascular do portador de anemia falciforme, nos âmbitos central e sistêmico.

3 OBJETIVOS

Geral

Avaliar a resistência vascular arterial por meio da ultrassonografia Doppler e sua associação com biomarcadores de hemólise, em jovens portadores de anemia falciforme.

Específicos

1. Avaliar por dopplerfluxometria o leito vascular arterial dos rins em portadores de anemia falciforme;
2. Descrever os achados dopplervelocimétricos arteriais dos membros inferiores nessa população;
3. Descrever os achados fluxométricos das órbitas nesses pacientes;
4. Verificar a associação entre os achados dopplervelocimétricos arteriais e biomarcadores de hemólise em cada um dos referidos leitos vasculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

O trabalho foi realizado no Ambulatório de Hematologia Pediátrica em parceria com o serviço de Radiologia e Diagnóstico por Imagem do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS). Os exames ultrassonográficos foram realizados no próprio hospital. Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório Central do HU/UFS. O recrutamento dos sujeitos e as avaliações laboratorial e ecográfica foram efetuados no período de setembro de 2012 a outubro de 2013.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo os pacientes portadores de anemia falciforme (homozigotos, padrão SS) comprovada por eletroforese de hemoglobina, que fazem acompanhamento regular no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do HU/UFS, e que não apresentaram quadro de descompensação aguda (febre, crises álgicas, priapismo, síndrome torácica aguda, acidente vascular encefálico); episódio de hemotransfusão nos últimos três meses que antecederam a coleta de dados; e antecedente de nefropatia e de oftalmopatia.

Foram excluídos pacientes que apresentaram:

- a) taquicardia, hipertensão arterial sistêmica, dispneia ou falta de cooperação durante a avaliação ultrassonográfica;
- b) úlcera de membros inferiores ou vasculopatia arterial periférica de qualquer natureza.

4.4 CASUÍSTICA

Tamanho amostral

A fórmula $n = (Z_{\alpha/2} * \sigma / E)^2$ foi utilizada para o cálculo do tamanho da amostra (n), em que $Z_{\alpha/2}$ corresponde ao valor Z crítico para o intervalo de confiança de 95%; σ , ao desvio-padrão na população; E , à margem de erro. Já que não foram encontrados dados sobre o desvio-padrão populacional, utilizou-se o desvio-padrão da amostra (s) em lugar de σ para fins de cálculo. Após estudo-piloto com 39 pacientes, os valores $s = 13,05$ cm/s e $E = 3,0$ cm/s foram obtidos, e o valor $Z_{\alpha/2} = 1,96$ com base em tabela estatística, o que resultou em tamanho amostral estimado de 73 pacientes.

São acompanhados mensalmente 160 pacientes no Ambulatório de Hematologia Pediátrica, de onde foram selecionados e recrutados os sujeitos que compuseram a amostra.

Sujeitos

Foram avaliados 105 sujeitos, divididos em dois grupos: um formado por 73 pacientes, outro por 32 controles.

O grupo de pacientes foi constituído por todos os que preencheram os critérios de inclusão, em amostragem por conveniência com seleção consecutiva, composto de 38 masculinos e 35 femininos com idade entre 3 e 31 anos. O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis, sem evidência de doença hematológica, pareados por gênero e idade com o grupo de pacientes, sendo 16 masculinos e 16 femininos com idade entre 3 e 27 anos, recrutados aleatoriamente dentre sujeitos da comunidade, atendidos rotineiramente no Ambulatório.

Todos os sujeitos foram submetidos a exame clínico e ao estudo ecográfico, seguido de venipuntura periférica para realização de hemograma, dosagem sérica de bilirrubina total e indireta e de desidrogenase láctica. Em cada participante, todos os exames foram realizados no mesmo dia.

Protocolo

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foi aplicado questionário sucinto para coleta de dados clínicos e demográficos e registro da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica e diastólica, aferidas no momento da coleta.

Em seguida foi avaliada por ultrassonografia com Doppler, nos modos colorido e espectral, a vascularização arterial das estruturas abaixo:

- a) órbitas: artérias oftálmica e central da retina;
- b) rins: artérias renal principal, segmentares e interlobares (ou intrarrenais);
- c) membros inferiores: artérias poplítea, tibial anterior e tibial posterior.

O estudo dopplervelocimétrico foi realizado no equipamento Logiq P6 (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) com transdutor convexo modelo 4C multifrequencial de 1,6 a 4,6 MHz para os rins, e com transdutor linear modelo 11L multifrequencial de 3,4 a 10,8MHz para as órbitas e os membros inferiores, de acordo com técnica estabelecida na literatura (KUZMIĆ, 2000; ZWIEBEL, 2005; TAORI, 2008). Os pacientes foram examinados em posição supina, com técnica não compressiva e sob condições confortáveis para aquisição da curva espectral. A identificação colorida das artérias facilitou o posicionamento do volume amostral, com o menor ângulo possível entre o feixe ultrassônico e o vaso insonado.

Em cada artéria, a partir da curva espectral, foram mensuradas as seguintes variáveis, com até duas casas decimais: velocidade de pico sistólico (VPS), velocidade diastólica final (VDF), velocidade média (VM), índice de pulsatilidade (IP) e índice de resistência (IR). As velocidades foram expressas em centímetros por segundo (cm/s), e os índices são adimensionais. Em cada variável, a medida considerada foi a média aritmética de três aferições à direita e três à esquerda, a fim de reduzir o erro aleatório e aumentar a precisão.

Nos rins, as artérias segmentares e interlobares foram avaliadas em seus ramos polar superior, interpolar e polar inferior.

Todos os exames ecográficos foram realizados por um único investigador devidamente habilitado, com experiência no método, cego para o alocamento dos sujeitos, cuja identificação era desconhecida pelo referido investigador. O recrutamento e transporte dos sujeitos até o serviço de Radiologia foi realizado por outros membros do grupo de pesquisa, com preservação do anonimato do sujeito, para não prejudicar o cegamento do ultrassonografista. O tempo médio de exame foi de aproximadamente 60 minutos por paciente.

Após o estudo ultrassonográfico, foi coletada amostra de sangue de todos os participantes do estudo para envio ao Laboratório Central e realização de hemograma completo, para avaliação de hemoglobina (Hb, expressa em g/dL), número de hemácias (Hm, $\times 10^6/\mu\text{L}$), hematócrito (Ht, em %), volume corpuscular médio (VCM, em fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, em pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM,

em g/dL) e contagem de reticulócitos (Ret, em %), por método automatizado (Labmax, Labtest, Minas Gerais, Brasil); e investigação bioquímica com dosagem de bilirrubina total e fração indireta (BT e BI, em mg/dL) e desidrogenase láctica (DHL, em U/L), de modo automatizado (Cell-Dyn, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). Como biomarcadores de hemólise (KATO, 2009), foram considerados Hb, Rt, BT, BI e DHL.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas foram tabuladas em banco de dados próprio, sendo todas variáveis contínuas (idade e parâmetros laboratoriais e dopplerfluxométricos), apresentadas sob a forma de média e desvio-padrão.

Foi aplicado o teste de D'Agostino-Pearson para verificar o pressuposto de normalidade da distribuição dos dados.

Para comparação entre os grupos, o valor p foi calculado pelo teste t não pareado ou pelo teste de Mann-Whitney para amostras independentes. Para verificar a relação existente entre os biomarcadores de hemólise e os índices de resistência vascular (IR e IP), foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e realizada análise de regressão linear multivariada. A força de associação foi considerada, para valores absolutos de r_s , como segue: $0 \leq r_s < 0,2$, como muito fraca; $0,2 \leq r_s < 0,4$, como fraca; $0,4 \leq r_s < 0,6$, como moderada; $0,6 \leq r_s < 0,8$, como forte; $0,8 \leq r_s < 1,0$, como muito forte.

Todos os testes estatísticos foram bicaudais, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada com o auxílio do aplicativo BioEstat versão 5.3 (AnalystSoft, Inc.).

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Sergipe, sob CAAE nº 055.95812.0.000.0058.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO 1

RENAL DOPPLER SONOGRAPHY IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA: RELATIONSHIP WITH HEMOLYSIS BIOMARKERS

Renal Doppler sonography in patients with sickle cell anemia: relationship with hemolysis biomarkers

Thiago de Oliveira Ferrão¹, Paulo Ricardo Saquete Martins-Filho², Cleverton Canuto Aragão¹, Marlyson Ronyere Neves Santana¹, Demetrius Silva Santana¹, Rosana Cipolotti¹

¹ Department of Medicine, Federal University of Sergipe, Brazil.

² Investigative Pathology Laboratory, Federal University of Sergipe, Brazil.

Corresponding Author: Thiago de Oliveira Ferrão

Rua Anita Garibaldi, 550 – apto. 501 – Centro. Caçador-SC. CEP: 89500-000. Tel 55 (49) 9200-9965.

Email: ferroferrao@gmail.com

Abstract

Background. Sickle cell anaemia (SCA) is a frequent cause of renal dysfunction leading to sickle nephropathy in the later stages. It is recognised that haemolysis plays a significant role in disease pathogenesis, possibly via decreased bioavailability of nitric oxide, impairing endothelium-dependent vasodilatation. Doppler sonography enables non-invasive assessment of renal vascular resistance, which is especially important for the evaluation of blood flow in renal diseases. **Objective.** The aim of this study was to investigate the state of renal vascular resistance by means of Doppler sonography in steady state patients with SCA, and its relationships with haemolysis biomarkers. **Materials and methods.** Two groups were examined in this cross-sectional study. One group consisted of 71 outpatients with SCA and the control group consisted of 32 matched, healthy subjects. All participants were evaluated by means of renal Doppler sonography and laboratory tests. **Results.** All laboratory markers were abnormal in the SCA patients compared with the control subjects ($p < 0.0001$). Doppler sonography evaluation revealed significantly increased flow velocities and high vascular resistance in the patients group in the main renal, segmental and interlobar arteries ($p < 0.0001$). Multiple linear regression analysis showed a negative relationship between haemoglobin and vascular resistance indices in all investigated vessels. Moderate direct correlation was found between lactate dehydrogenase and resistance indices in segmental arteries. **Conclusion.** Renal vascular resistance evaluated by means of Doppler sonography is elevated in steady state SCA patients and shows moderate to strong correlation with haemolysis biomarkers.

Keywords sickle cell anemia – Doppler sonography – renal – hemolysis biomarkers

Introduction

Sickle cell anaemia (SCA), the homozygous form of sickle cell disease (SCD), is one of the most common inherited haemoglobinopathies [1, 2]. Estimates suggest that 250,000 children are born annually with SCA worldwide. Originally from Africa and brought to the Americas by the forced immigration of slaves, it is more frequent where the proportion of African descendants is greater. It is estimated that approximately 2500 children are born every year with SCA in Brazil. In this country, the non-white population was estimated at 50.74% by the 2010 Population Census and from 1% to 6% of them have SCA [3].

SCD is characterized by the production of abnormal haemoglobin, known as haemoglobin S. Sickled erythrocytes are formed during the intracellular polymerisation and precipitation of haemoglobin S in the deoxygenated state. This results in red cell rigidity that causes poor microvascular blood flow with consequent tissue ischemia and infarction [4, 5]. It is recognised that haemolysis also plays a significant role in disease pathogenesis, possibly via decreased bioavailability of nitric oxide (NO) produced by vascular endothelial cells [6]. The clinical features of this multisystem disorder result from chronic haemolytic anaemia and vaso-occlusive consequences of sickled cells, affecting almost every tissue in the body. SCA is a frequent cause of kidney dysfunction leading to sickle nephropathy in the later stages [7, 8]. Early studies have shown that in SCA the kidney is affected by consequences of vaso-occlusion which are specially marked within the renal medulla and vasa recta [9, 10]. However, more recent studies have also shown impaired vascular resistance, impaired endothelium-dependent vasodilatation and NO deficiency in patients with SCA [4–6].

Renal Doppler sonography enables non-invasive assessment of renal vascular resistance, by measuring resistive (RI) and pulsatility (PI) indices. This is especially important for the evaluation of blood flow in renal diseases [11]. Previous studies have described renal Doppler flow patterns in SCD patients in developing countries with high prevalence of the

disease, such as India, Turkey, Jamaica, and Nigeria[4, 7, 10]. However, to our knowledge, little is known about renovascular changes in Brazilian SCA patients as well as its relationship with haemolysis markers. The aim of this study was to investigate the state of renal vascular resistance by means of Doppler sonography in steady state patients with SCA, and its relationships with haemolysis biomarkers.

Materials and methods

Design

A cross-sectional study was carried out from September 2012 to October 2013 in the Diagnostic Imaging Department and in the Pediatric Hematology Oncology Clinic of the University Hospital, Federal University of Sergipe, Brazil.

Sample size

The formula $n = (Z_{\alpha/2} * \sigma / E)^2$ was adopted to calculate the sample size (n), in which $Z_{\alpha/2}$ is regarded as critical Z-value for 95% confidence level; σ , as population standard deviation; E , as margin of error. Since the σ value is unknown, the sample standard deviation s was used. Based on a previous pilot study with 39 patients, the values $s = 13.05\text{cm/s}$ and $E = 3.0\text{cm/s}$ were calculated, and $Z_{\alpha/2} = 1.96$ was obtained from statistical tables, resulting in an estimated sample size of 73 patients.

Subjects

Two groups (105 subjects in total) were examined. One group consisted of 73 outpatients with SCA (homozygous SS pattern confirmed by haemoglobin electrophoresis) composed of 38 males and 35 females with an age range of 3-31 years and without recent history (during the preceding three months) of painful crisis or transfusion. These patients

were followed up in the haematological clinic in steady state (defined as a normal baseline status without acute pain requiring hospitalisation). The other group was a control group, consisting of 32 age- and sex-matched, apparently healthy subjects (16 males and 16 females, age range 3-27 years) without evidence of clinical history of pathologic changes. The control subjects were recruited randomly among community people, routinely attending in the sonography department. Both groups had no clinical, laboratory, or radiological evidence of renal disease. All patients and control subjects gave written informed consent prior to their participation in the study. Approval was obtained from the ethics committee.

Doppler sonography protocol

Doppler sonography was performed on a Logiq P6 scanner (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) with colour and power Doppler flow facilities, using a multifrequency 1.6- to 4.6-MHz convex (4C) probe, according to commonly used techniques[7, 11]. The patients were examined in the supine position: left lateral decubitus for the right kidney and right lateral decubitus for the left kidney. Doppler sonography was performed using the non-compression technique and waveforms were obtained under comfortable conditions. Main renal, segmental, and interlobar arteries were then insonated using a 2-4mm Doppler gate. Colour identification of these arteries considerably facilitated the positioning of the Doppler sample volume, and examinations were performed at the lowest possible angle between the ultrasonic beam and the insonated vessel. The Doppler parameters recorded for all the subjects were peak systolic velocity (PSV), end diastolic velocity (EDV), mean velocity (MV), resistive (RI) and pulsatility (PI) indices. Each parameter was measured only when at least three consecutive waveforms with similar appearance were observed. Only optimal spectral waveforms for a particular vessel were used for measurement. Measurements were obtained with the existing software capabilities of the scanner. RI and PI were calculated in

the conventional manner with the following formulas: $RI = (PSV - EDV)/PSV$, and $PI = (PSV - EDV)/MV$. Doppler parameters were obtained for main renal, segmental, and interlobar arteries. Three readings from the interlobar arteries in the upper pole, interpolar, and lower pole regions were taken and average values of interlobar parameters were recorded for each kidney. The mean of the Doppler parameters from main renal, segmental, and interlobar arteries of both kidneys of a patient were taken and recorded. The average duration of the Doppler assessment per single subject was 30 minutes. However, this was largely dependent on the cooperation of the subjects to hold their breath for the required intervals. Heart rates (HR) and systolic and diastolic pressures were assessed during the investigation. All subjects were normotensive at the time of renal sonography. Patients who were dyspneic or unable to hold their breath as required were excluded from the study. Those patients with painful crisis, tachycardia, or known hypertensive disease were also excluded from the study. All the examinations were performed by the same radiologist, with experience, who was blind to the assignment of the subjects as SCA patients or controls.

Laboratory investigation

Blood samples were taken from all study participants for a routine blood count by an automated haematology analyser (Labmax, Labtest, Minas Gerais, Brazil) including measurement of red blood cell (RBC) count, haemoglobin (Hb) level, haematocrit (Ht) value, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) and reticulocyte (Ret) count. The biochemical investigation included measurement of total and indirect bilirubin levels, and lactate dehydrogenase (LDH) levels by an automated analyser (Cell-Dyn, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). Haemoglobin, reticulocyte count, total and indirect bilirubin and LDH levels were considered to be markers of chronic intravascular haemolysis[5].

Statistical analysis

Distributions of groups of patients and control subjects were tested for the normality of data (D'Agostino-Pearson test). Mean with standard deviation were calculated for age, laboratory variables and Doppler parameters (PSV, EDV, MV, RI and PI). For comparison between groups, p values were calculated using unpaired t -test or Mann-Whitney test. To assess whether any relationship existed between haemolysis laboratory markers (Hb, Ret, LDH, total bilirubin and indirect bilirubin levels) and vascular resistance indices (RI and PI), multiple linear regression analysis was carried out. Spearman's test was performed after the regression analysis to measure the strength of correlation of the variables with statistical significance. The strength of association was labelled, for absolute values of r_s , as follows: $0 \leq r_s < 0.2$ was regarded as very weak; $0.2 \leq r_s < 0.4$ as weak, $0.4 \leq r_s < 0.6$ as moderate, $0.6 \leq r_s < 0.8$ as strong and $0.8 \leq r_s < 1.0$ as very strong. All statistical tests were 2-sided, with p value ≤ 0.05 considered to be significant. Statistical analysis was carried out with BioStat version 5.3 (AnalystSoft, Inc.).

Results

Two females were excluded from the group of 73 patients with SCA due to lack of cooperation. However this did not cause any problems with following up the remaining participants. The final sample consisted of 71 patients with SCA compared with 32 control subjects. Neither group showed any differences with regard to age and heart rate (Table 1). All laboratory markers were abnormal in the SCA patients compared with the control subjects ($p < 0.0001$ for all comparisons).

Doppler sonography evaluation revealed significantly increased renal flow velocities (PSV and MV) and renal vascular resistance (RI and PI) in the patients compared to the

control group in both main renal arteries, segmental arteries and interlobar arteries ($p < 0.0001$). EDV was also elevated in the patients group in all arteries, although this increase was not significant (Table 2).

Multiple linear regression of the relationship between haemolysis laboratory markers and vascular resistance indices revealed a significant association between Hb and RI (Table 3) and between Hb and PI (Table 4), in all investigated arteries. In the case of LDH levels, although the p -values were statistically significant in segmental arteries, the regression coefficients were very close to zero with respect to both RI and PI. In other arteries, no association was observed between LDH levels and both indices. Reticulocyte, total bilirubin and indirect bilirubin did not associate with resistance indices in any of the arteries.

Due to the significant findings relating Hb and LDH to RI and PI, detected by multivariate analysis, Spearman's coefficient of linear correlation (r_s) was calculated and scatter plots with fit line for the bivariate analysis were generated to illustrate this relationship in each artery. Strong inverse correlation ($0.6 \leq |r_s| < 0.8$) was observed between Hb and the resistance indices in all arteries (Figure 1). Moderate direct correlation ($0.4 \leq r_s < 0.6$) was found between LDH and both indices in segmental arteries (Figure 2).

Discussion

Recent studies have classified the SCA clinical complications into two distinct sub-phenotypes: vasculopathy-endothelial dysfunction (which includes pulmonary hypertension, priapism, leg ulceration and stroke and is more common in patients who suffer from higher rates of intravascular haemolysis); and the viscosity-vaso-occlusive sub-phenotype (comprised of vaso-occlusive pain crisis, acute chest syndrome and osteonecrosis)[5, 12, 13]. The rate of chronic intravascular haemolysis can be estimated through laboratory markers,

characterized as follows: low steady state haemoglobin levels, high LDH levels, high bilirubin levels and high reticulocyte counts [1, 5].

The kidneys are usually affected in later stages of disease in form of chronic kidney disease, similar to lungs and brain in form of pulmonary hypertension and stroke, respectively[14], both complications of vasculopathy sub-phenotype. De Castro et al. [15]have described an association between renal dysfunction markers with pulmonary hypertension. Experimentally induced haemolysis in dogs provokes pulmonary hypertension and renal dysfunction [16]. This evidence suggests a possible relationship between renal disorder and the haemolysis-vasculopathy subphenotype.

Microcirculatory flow disturbances lead to altered vascular haemodynamics, as demonstrated previously in an experimental study using non-invasive ultrasonic approaches[17].Doppler ultrasound has been applied in the screening and assessment of some SCA clinical complications: transthoracic Doppler-echocardiography in screening of adults for pulmonary hypertension [5]; transcranial Doppler ultrasound in detection of intracranial arterial stenosis, allowing primary stroke prevention through initiation of chronic transfusions in children[18]. Doppler resistive indices are accepted as useful parameters for quantifying the alterations in renal blood flow that may occur with kidney disease [19]. In our study, Doppler sonography was used to assess renal vascular resistance and its relationship to biomarkers of intravascular haemolysis.

All haematological and biochemical tests were abnormal in the SCA patients, indicating high rates of haemolysis. We have also found increased vascular resistance with high Doppler velocities and elevated indices in SCA patients relative to controls, in agreement with prior studies[4, 7, 10, 20], compatible with severe intravascular haemolysis. NO is produced by the endothelium and regulates basal vasodilator tone, among other functions. Under normal conditions, haemoglobin is safely packaged within the erythrocyte plasma

membrane; however, during haemolysis it is decompartmentalized and released into plasma, where it rapidly reacts with and destroys NO. This results in abnormally high NO consumption and the formation of reactive oxygen species, ultimately inhibiting vasodilation. The normal balance of vasoconstriction:vasodilation is then skewed toward vasoconstriction [5, 12, 21]. Chronic NO depletion contributes to vasoconstriction and proliferative vasculopathy, which promotes increased vascular resistance, which in turn can be detected by Doppler velocimetry.

In our sample, the EDV variable did not show statistically significant difference between patients and control subjects in any evaluated artery, which disagrees with the findings of Guvenç et al.[4]. However, De Souza et al.[22] have shown normal coronary flow reserve in SCA, suggesting preserved coronary microcirculation, and that episodes of vaso-occlusion would not be responsible for the cardiologic findings in this disease. They have considered that tissue hypoxia in SCA determines reduction of coronary arteriolar resistance, leading to an increased coronary flow at steady state. Despite the difference between cardiac and renal arterial beds, this could explain our findings with respect to EDV. Another proposed explanation is that high cardiac output, which is reasoned to be a compensatory response to anaemia, lowers the resting tone of resistance vessels and reduces the contractile state; indeed, diastolic blood pressure is typically low-to-normal in SCA patients [1].

In previous studies, an RI value of < 0.70 has been regarded as the normal value[7, 10] for differentiating patients with high and normal renal vascular resistance. Our patients showed higher RI and PI mean values than control subjects in all arteries. Although all RI mean values of SCA group were lower than 0.70, this is still consistent with previous reports[4, 10]. The PI mean values of SCA group were lower than the PI values in other studies[4, 7, 10]. However these reports showed much more variability in the results of PI mean values, impairing their comparability.

Multiple linear regression analysis showed strong inverse correlation between haemoglobin and resistance indices in all examined arteries. In other words, the more severe anaemia (less haemoglobin implies more haemolysis and less NO), the higher the blood flow resistance (more vasoconstriction). These data are consistent with the previous report of Aikimbaev et al.[10], who described only moderate inverse correlations. LDH showed moderate direct correlation with resistance indices only in segmental arteries. Although LDH level is considered to be a surrogate marker of intravascular haemolysis [5], LDH appears not to have the same pathophysiologic impact as haemoglobin when correlated with Doppler parameters [20]. According to our multivariate analysis, the very small regression coefficient of LDH indicates that a huge variation of this marker would be required to change the resistance indices, which would make it less significant than haemoglobin as a marker of haemolysis.

A limitation of this study was that only one radiologist performed the Doppler ultrasound evaluation. This meant that, although the radiologist was blind to the assignment of the subjects, we could not determine inter-observer agreement.

Conclusion

This study demonstrates that renal vascular resistance evaluated by means of Doppler sonography is elevated in steady state patients with SCA, and shows moderate to strong correlation with haemolysis biomarkers.

Conflicts of Interest

There is no conflict of interest in this paper.

References

1. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT (2008) Sick cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 44:1506–28. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.008
2. Tharaux P-L (2011) Endothelin in renal injury due to sickle cell disease. *Contrib Nephrol* 172:185–99. doi: 10.1159/000328699
3. Lervolino LG, Baldin PEA, Picado SM, et al. (2011) Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. *Rev Bras Hematol Hemoter* 33:49–54. doi: 10.5581/1516-8484.20110015
4. Guvenc B, Aikimbaev K, Unsal C, et al. (2005) Renal vascular resistance in sickle cell painful crisis. *Int J Hematol* 82:127–31. doi: 10.1532/IJH97.E0412
5. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT (2009) Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol* 84:618–25. doi: 10.1002/ajh.21475
6. Akinsheye I, Klings ES (2010) Sickle cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. *J Cell Physiol* 224:620–5. doi: 10.1002/jcp.22195
7. Taori KB, Chaudhary RS, Attarde V, et al. (2008) Renal Doppler indices in sickle cell disease: early radiologic predictors of renovascular changes. *AJR Am J Roentgenol* 191:239–42. doi: 10.2214/AJR.07.3125
8. Zawar SD, Vyawahare MA, Nerkar M, Jawahirani AR (2005) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in sickle cell disease by Doppler ultrasonography. *J Assoc Physicians India* 53:677–80.
9. Francis RB, Johnson CS (1991) Vascular occlusion in sickle cell disease: current concepts and unanswered questions. *Blood* 77:1405–14.
10. Aikimbaev KS, Oğuz M, Güvenç B, et al. (1998) Color doppler ultrasonography of renal vascular resistance in sickle cell disease: Clinical implications. *Int J Angiol* 7:144–146. doi: 10.1007/BF01618387
11. Kuzmić AC, Brkljacić B, Ivanković D, Galesić K (2000) Doppler sonographic renal resistance index in healthy children. *Eur Radiol* 10:1644–8.
12. Morris CR (2008) Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 177–85. doi: 10.1182/asheducation-2008.1.177
13. Zorca S, Freeman L, Hildesheim M, et al. (2010) Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *Br J Haematol* 149:436–45. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08109.x

14. Zago MA, Pinto ACS (2007) Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. doi: 10.1590/S1516-84842007000300003
15. De Castro LM, Jonassaint JC, Graham FL, et al. (2008) Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: clinical and laboratory endpoints and disease outcomes. *Am J Hematol* 83:19–25. doi: 10.1002/ajh.21058
16. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, et al. (2005) Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 115:3409–17. doi: 10.1172/JCI25040
17. Stoyanova E, Trudel M, Felfly H, et al. (2007) Characterization of circulatory disorders in beta-thalassemic mice by noninvasive ultrasound biomicroscopy. *Physiol Genomics* 29:84–90. doi: 10.1152/physiolgenomics.00305.2005
18. Verlhac S, Balandra S, Cussenot I, et al. (2014) Extracranial carotid arteriopathy in stroke-free children with sickle cell anemia: detection by submandibular Doppler sonography. *Pediatr Radiol* 44:587–96. doi: 10.1007/s00247-014-2880-9
19. Winther SO, Thiesson HC, Poulsen LN, et al. (2012) The renal arterial resistive index and stage of chronic kidney disease in patients with renal allograft. *PLoS One* 7:e51772. doi: 10.1371/journal.pone.0051772
20. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, et al. (2008) G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood* 112:4314–7. doi: 10.1182/blood-2008-03-143891
21. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH (2007) Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 21:37–47. doi: 10.1016/j.blre.2006.07.001
22. De Souza JL, Rodrigues ACT, Buck PC, et al. (2007) Coronary flow reserve in sickle cell anemia. *Arq Bras Cardiol* 88:552–8.

Table 1. Clinical characteristics of sickle cell anemia patients and healthy control subjects.

Parameters	Patients (n=73) Mean values (SD)	Control Group (n=32) Mean values (SD)	<i>p</i> -value
Age, years	14.3 (7.6)	16.4 (7.8)	0.205
HR, beats/minute	79.9 (13.2)	74.7 (11.7)	0.060
Hb, g/dL	7.69 (1.18)	13.68 (1.27)	<0.0001
Ht, %	22.38 (3.55)	41.44 (3.30)	<0.0001
RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$	2.43 (0.37)	4.97 (0.43)	<0.0001
Ret, %	11.82 (5.29)	0.94 (0.46)	<0.0001
MCV, fL	91.17 (9.40)	76.75 (19.31)	<0.0001
MCH, pg	31.32 (3.50)	34.44 (18.68)	<0.0001
MCHC, g/dL	34.36 (1.57)	33.0 (1.36)	<0.0001
LDH, U/L	1406.23 (544.29)	385.43 (129.93)	<0.0001
T-Bil, mg/dL	4.46 (3.47)	0.42 (0.19)	<0.0001
I-Bil, mg/dL	3.74 (3.19)	0.28 (0.15)	<0.0001

Note: *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

HR, heart rate; Hb, haemoglobin; Ht, haematocrit; RBC, red blood cells; Ret, reticulocyte; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; T-Bil, total bilirubin; I-Bil, indirect bilirubin; LDH, lactate dehydrogenase.

Table 2. Doppler sonography parameters of renal vascular flow and resistance indices.

Parameters	Patients (n=73) Mean values (SD)	Control Group (n=32) Mean values (SD)	<i>p</i> -value
Main renal artery			
PSV, cm/s	114.0 (19.3)	82.8 (17.0)	<0.0001
EDV, cm/s	35.3 (7.4)	32.8 (5.7)	0.090
MV, cm/s	61.5 (9.6)	49.4 (8.8)	<0.0001
RI	0.69 (0.06)	0.60 (0.05)	<0.0001
PI	1.29 (0.22)	1.00 (0.15)	<0.0001
Segmental artery			
PSV, cm/s	62.2 (12.6)	45.5 (8.9)	<0.0001
EDV, cm/s	21.0 (4.0)	20.0 (3.7)	0.242
MV, cm/s	34.7 (6.2)	28.5 (5.2)	<0.0001
RI	0.66 (0.05)	0.56 (0.04)	<0.0001
PI	1.18 (0.17)	0.89 (0.12)	<0.0001
Interlobar artery			
PSV, cm/s	37.2 (8.0)	27.3 (4.7)	<0.0001
EDV, cm/s	13.4 (3.1)	12.5 (2.0)	0.253
MV, cm/s	21.3 (4.5)	17.4 (2.7)	<0.0001
RI	0.64 (0.05)	0.54 (0.05)	<0.0001
PI	1.12 (0.16)	0.85 (0.12)	<0.0001

Note: *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

PSV, peak systolic velocity; EDV, end diastolic velocity; MV, mean velocity; RI, resistive index; PI, pulsatility index.

Table 3. Multiple linear regression of the effects of haemolysis markers on renal arterial resistive index.

Haemolysis markers	Main Renal Artery			Segmental Artery			Interlobar Artery		
	Regression coefficient	T	p-value	Regression coefficient	T	p-value	Regression coefficient	T	p-value
Hb, g/dL	-0.0097	-2.741	0.007	-0.0171	-6.352	<0.0001	-0.0180	-6.280	<0.0001
Ret, %	0.0004	0.308	0.758	-0.0016	-1.570	0.119	-0.0009	-0.841	0.402
LDH, U/L	0.0000	1.916	0.058	0.0000	2.461	0.015	0.0000	0.740	0.461
T-Bil, mg/dL	0.0122	1.360	0.177	0.0059	0.874	0.384	0.0066	0.917	0.361
I-Bil, mg/dL	-0.0132	-1.344	0.182	-0.0093	-1.242	0.217	-0.0089	-1.130	0.261

Note: *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Hb, haemoglobin; Ret, reticulocyte; LDH, lactate dehydrogenase; T-Bil, total bilirubin; I-Bil, indirect bilirubin.

Table 4. Multiple linear regression of the effects of haemolysis markers on renal arterial pulsatility index.

Haemolysis markers	Main Renal Artery			Segmental Artery			Interlobar Artery		
	Regression coefficient	T	p-value	Regression coefficient	T	p-value	Regression coefficient	T	p-value
Hb, g/dL	-0.0325	-2.701	0.008	-0.0523	-6.110	<0.0001	-0.0501	-5.970	<0.0001
Ret, %	0.0012	0.269	0.788	-0.0055	-1.706	0.091	-0.0028	-0.903	0.368
LDH, U/L	0.0001	1.804	0.074	0.0001	2.407	0.018	0.0000	0.747	0.456
T-Bil, mg/dL	0.0406	1.335	0.185	0.0132	0.613	0.541	0.0210	0.989	0.325
I-Bil, mg/dL	-0.0453	-1.360	0.176	-0.0248	-1.048	0.297	-0.0280	-1.208	0.230

Note: *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Hb, haemoglobin; Ret, reticulocyte; LDH, lactate dehydrogenase; T-Bil, total bilirubin; I-Bil, indirect bilirubin.

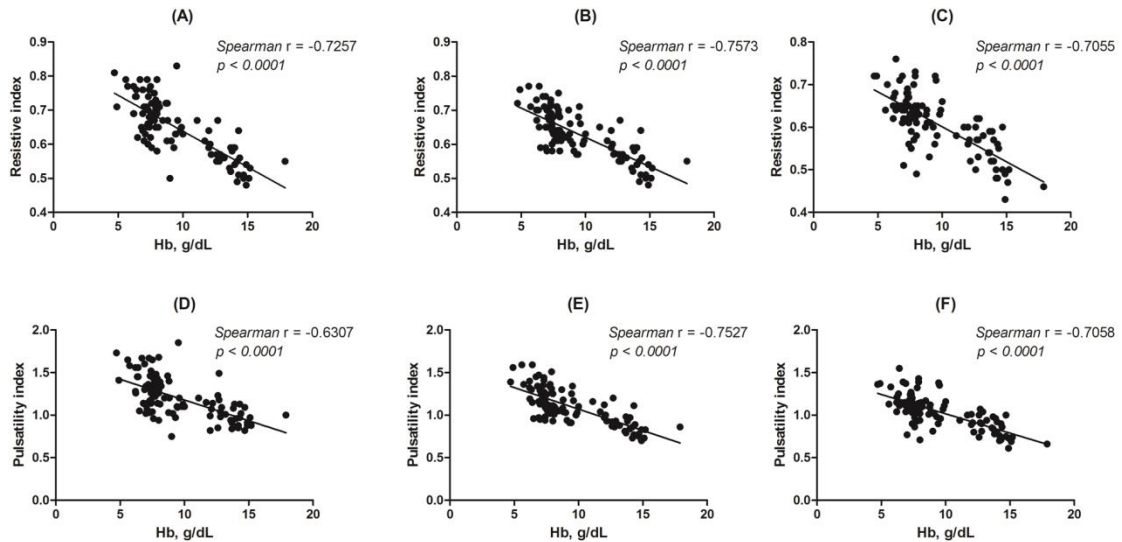


Fig. 1 Correlation analysis between haemoglobin (Hb) levels and vascular resistance indices. (a) and (d) main renal artery, (b) and (e) segmental artery, (c) and (f) interlobar artery. Strong inverse correlation was observed between Hb and RI (a to c) and between Hb and PI (d to f) in all arteries.

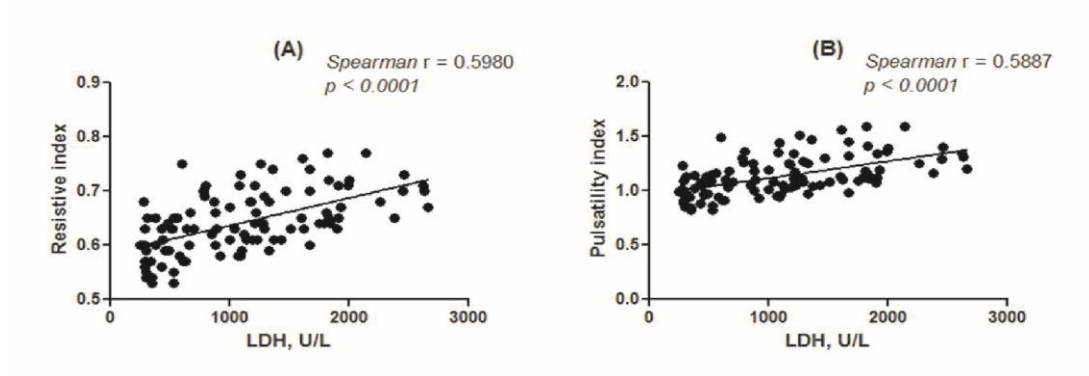


Fig. 2 Correlation analysis between lactate dehydrogenase (LDH) levels and vascular resistance indices. Moderate direct correlation was observed between LDH and RI (a), and between LDH and PI (b) in segmental artery.

5.2 ARTIGO 2

**DOPPLER ULTRASONOGRAPHY OF LOWER LIMB
ARTERIES IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA:
A CORRELATION OF ARTERIAL FLOW VELOCITY
WITH HEMOLYSIS BIOMARKERS**

Submetido ao periódico **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** em 24/09/2015 sob o formato de *original article*.

Fator de impacto 2014: 2,699

Versão em inglês revista e certificada pela Editage.

Doppler ultrasonography of lower-limb arteries in patients with sickle-cell anemia: A correlation of arterial flow velocity with hemolysis biomarkers

Thiago de Oliveira Ferrão, MSc^{1*}, Paulo Ricardo Saquete Martins-Filho, PhD², Marlyson Ronyere Neves Santana, MD¹, Allan Ramon Santos Nascimento, MD¹, Leonardo Costa Ferraz, MD¹, Marconi Menezes Maia, MD¹, Rosana Cipolotti, PhD¹

¹ Department of Medicine, Federal University of Sergipe, Brazil

² Investigative Pathology Laboratory, Federal University of Sergipe, Brazil

*Correspondence to:

Thiago de Oliveira Ferrão

Rua Anita Garibaldi, 550 – apto. 501 – Centro. Caçador-SC. CEP: 89500-000

Tel.: 55 (49) 9200-9965; Email: ferroferrao@gmail.com

Running title: Leg artery Doppler ultrasonography in sickle-cell anemia

Key words: Doppler ultrasonography; sickle-cell anemia; lower-limb arteries; hemolysis biomarkers

Text word count: 1380

Abstract word count: 138

ABSTRACT

This study aimed to evaluate arterial flow velocity (AFV) in the lower limbs by using Doppler ultrasonography in steady-state patients with sickle-cell anemia, and the correlation of AFV with the laboratory markers of hemolysis (hemoglobin level, reticulocyte count, lactate dehydrogenase level, and indirect bilirubin level). AFV measurements were obtained for popliteal, anterior tibial, and posterior tibial arteries. For all the arteries, the peak systolic velocity (PSV) values were significantly higher in 71 patients than in 32 age- and sex-matched, healthy control subjects. The reticulocyte count, lactate dehydrogenase level, and indirect bilirubin level showed a strong direct correlation with PSV. The hemoglobin level showed a strong inverse correlation with PSV. The findings of this study show that a high rate of hemolysis is related to increased AFV in the lower limbs, similar to the observation in other arterial territories.

INTRODUCTION

Sickle-cell anemia (SCA), a homozygous form of sickle-cell disease, is the most frequent severe hemoglobinopathy^{1,2}. A feature of SCA is an increase in the degree of intravascular hemolysis, which leads to endothelial damage and decompartmentalization of hemoglobin; this decompartmentalized hemoglobin reacts 1000-fold faster with endothelium-derived nitric oxide (NO) than hemoglobin within the red blood cells does, thereby reducing NO bioavailability³. The possible reduction of the vessel lumen due to NO depletion can lead to an increase in the intravascular blood flow rate, as compared to the flow rate in healthy individuals, because the flow rate is inversely proportional to the cross-sectional area of the vessel. Microcirculatory flow disturbances alter vascular hemodynamics, which can be assessed using noninvasive ultrasonic approaches⁴.

A normal physiological response to anemia is increased cardiac output. Cardiac output increases in normovolemic anemia; the magnitude of this increase is closely related to the reduction in blood viscosity. A reduction in blood viscosity decreases the resistance to blood flow, and consequently increases venous return and facilitates left ventricular emptying by decreasing the afterload. Sympathetic activation also occurs, which may increase the heart rate with or without an increase in myocardial contractility. However, in a normovolemic condition, these changes play a minor role in increasing the cardiac output⁵. SCA represents an aberration in the blood rheological properties caused by a loss of normal red cell deformability. The characteristically low hematocrit values compensate for the stiffness of the sickle cells; and thus, whole blood viscosity remains rather unaltered⁶. A recent study showed a positive and significant relationship between the hemoglobin level and blood viscosity⁷. A detailed discussion about blood viscosity and hemorheology are beyond the scope of the present study.

This study aimed to evaluate arterial flow velocity (AFV) in the lower limbs by using Doppler ultrasonography in steady-state patients with SCA, and the correlation of AFV with the laboratory markers of hemolysis.

MATERIALS AND METHODS

In this cross-sectional study, 2 groups (total, 103 subjects) with the same ethnicity profile were examined. One group consisted of 71 outpatients with SCA (homozygous SS pattern confirmed by hemoglobin electrophoresis; 38 male and 33 female patients; age range, 3–31 years). This group was followed in a hematological clinic, in steady-state condition, at the time of the study: no blood transfusion and absence of any acute episodes of infection, painful crisis, or priapism in the 3 months before inclusion in the study. The other group was a control group, consisting of 32 age- and sex-matched, apparently healthy subjects (16 male and 16 female subjects; age range, 3–27 years) without any evidence of a clinical history of pathologic changes. None of the subjects in either of the groups showed leg ulcers. All of the patients and control subjects gave written informed consent before their participation in the study. The ethics committee approved the study.

Color flow Doppler ultrasonography was performed on a Logiq P6 scanner (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA), using a multifrequency (3.4–10.8 MHz) linear (11L) transducer, as previously described⁸. With the patient in a supine position, the probe was applied to the skin, the depth and focus in B mode were adjusted, and the structures of interest were scanned in color and spectral modes. Popliteal, anterior tibial, and posterior tibial arteries were then insonated using a Doppler gate of 2–4 mm, at the smallest possible angle between the ultrasonic beam and the insonated vessel. Peak systolic velocity (PSV) was the Doppler parameter recorded for all the subjects. PSV was measured 3 times in each vessel, only when at least 3 consecutive waveforms with similar appearance were noted. The

measurements were obtained using the existing software capabilities of the scanner. The mean PSV readings of the 3 arteries in both the lower limbs of a subject were calculated. Other flow parameters (mean velocity, pulsatility index, and resistivity index) were not used, because they could affect the analysis; moreover, diastolic flow was absent, with the end diastolic velocity equal to zero. All the subjects were normotensive at the time of examination. All the examinations were performed by the same radiologist (with 7 years of experience), who was blinded to the group assignment.

Blood samples of all the participants were collected for the measurement of the markers of chronic intravascular hemolysis⁹: hemoglobin level and reticulocyte count were determined using an automated hematology analyzer (Labmax; Labtest, Minas Gerais, Brazil); and total and indirect bilirubin levels and lactate dehydrogenase (LDH) levels were determined using an automated analyzer (Cell-Dyn; Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA).

The normality of data distributions was tested using the D'Agostino–Pearson test for both the groups. Mean and standard deviation values were calculated for age, laboratory variables, and PSV. For comparison between groups, *P* values were calculated using the unpaired *t* test or Mann–Whitney *U* test. Spearman's correlation tests were performed to assess whether the laboratory markers of hemolysis were associated with PSV. The strength of association was labeled, for absolute values of *r*, as follows: $0 \leq r < 0.2$ was regarded as very weak; $0.2 \leq r < 0.4$, as weak; $0.4 \leq r < 0.6$, as moderate; $0.6 \leq r < 0.8$, as strong; and $0.8 \leq r < 1.0$, as very strong. All the statistical tests were 2 sided, and *P* value ≤ 0.05 was considered significant. Statistical analysis was carried out using BioStat version 5.3 (AnalystSoft Inc., Walnut, CA).

RESULTS

Both the groups did not differ with regard to age (Table 1). Compared with the control subjects, the patients with SCA showed abnormal levels of all the laboratory markers ($P < 0.0001$ for all comparisons). Doppler ultrasonography revealed significantly higher PSV values in the patients than in the control group, in all of the 3 arteries ($P < 0.0001$). Stenosis was not observed; there were not atheromatous plaques or mediointimal thickening, that produce reduction of cross-sectional area of the arteries.

Spearman's test showed a strong correlation between the hemolysis markers and PSV in all the 3 arteries (Table 2). A moderate direct correlation was found between the reticulocyte count and PSV in the anterior and posterior tibial arteries. A strong inverse correlation was observed between the hemoglobin level and PSV in all the arteries.

DISCUSSION

The results of the examination of the laboratory markers of the SCA patients indicated a high rate of chronic intravascular hemolysis, characterized by low steady-state hemoglobin levels, high LDH levels, high bilirubin levels, and high reticulocyte counts; these findings are consistent with the previous findings^{2,9}. Our data suggest that the high rate of intravascular hemolysis was strongly correlated to the increased AFV. Previous studies showed that cell-free hemoglobin increases vasoconstrictor tone. Increased reaction of hemoglobin with NO causes vascular NO deficiency that impairs vascular smooth muscle relaxation². Vasoconstriction reduces the artery cross-sectional area, which decreases the volume of the blood and increases the velocity of the blood flowing through the artery (Poiseuille's law). A reduction in peripheral blood flow contributes to poor distal cutaneous perfusion, which may contribute to the formation of chronic leg ulcers and to other risk factors, such as venous incompetence and abnormal autonomic vascular control^{10,11}.

In other arterial territories, the increase in AFV detected by an ultrasonic approach is a useful marker of hemodynamic disorders observed in other common complications of SCA. High pulmonary pressures in SCA are associated with the indices of hemolysis². Pulmonary artery systolic pressure (PASP) can be estimated by Doppler echocardiography using the tricuspid regurgitant velocity (TRV). A TRV of ≥ 3.0 m/s represents remarkably elevated PASP, which is a characteristic of pulmonary arterial hypertension¹². Transcranial Doppler (TCD) screening enables screening for the risk factors of a first stroke and thereby reduces the risk of stroke. Prophylactic chronic blood transfusion is recommended for children with a flow velocity of ≥ 200 cm/s (time average mean of maximum, measured by TCD) or ≥ 250 cm/s (PSV, measured by TCD imaging) in the intracranial internal carotid and proximal middle cerebral arteries¹³.

Doppler ultrasonography is an important tool in the clinical management of SCA^{14,15}. PSV measurement may help in the prediction of the clinical complications of SCA, such as leg ulcers, the pathophysiology of which may be related to low peripheral blood supply^{1,10}. In conclusion, our data show that a high rate of hemolysis is related to increased AFV in the lower limbs, similar to the observation in other arterial territories.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues from Federal University of Sergipe who provided insight and expertise that greatly assisted the research.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None of the authors has a conflict of interest to declare in relation to this work.

FINANCIAL SUPPORT

Not applicable.

AUTHORS' ADDRESSES

Thiago de Oliveira Ferrão

Rua Anita Garibaldi, 550 - apto. 501 – Centro. Caçador, SC, Brazil. CEP: 89.500-000

Email: ferroferrao@gmail.com

Paulo Ricardo Saquete Martins-Filho

Rua Cláudio Batista, s/n – Santo Antonio. Aracaju, SE, Brazil. CEP: 49.060-100

Email: martins-filho@ufs.br

Marlyson Ronyere Neves Santana

Rua Cláudio Batista, s/n – Santo Antonio. Aracaju, SE, Brazil. CEP: 49.060-100

Email: marlysonneves@gmail.com

Allan Ramon Santos Nascimento

Rua Cláudio Batista, s/n – Santo Antonio. Aracaju, SE, Brazil. CEP: 49.060-100

Email: allan_contato@hotmail.com

Leonardo Costa Ferraz

Rua Cláudio Batista, s/n – Santo Antonio. Aracaju, SE, Brazil. CEP: 49.060-100

Email: t_vivaldi_f@bol.com.br

Marconi Menezes Maia

Rua Cláudio Batista, s/n – Santo Antonio. Aracaju, SE, Brazil. CEP: 49.060-100

Email: marconiufcg@gmail.com

Rosana Cipolotti

Av. Beira Mar, 2016 – apto. 402 – 13 de julho. Aracaju, SE, Brazil. CEP: 49.025-040

Email: rosanaci@hotmail.com

REFERENCES

1. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT, Bonds DR, Brambilla D, 1998. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 339: 5–11.
2. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT, 2008. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 44: 1506–1528.
3. Guvenc B, Aikimbaev K, Unsal C, Akgul E, Akgul AE, Binokay F, Besena A, 2005. Renal vascular resistance in sickle cell painful crisis. *Int J Hematol* 82: 127–131.
4. Stoyanova E, Trudel M, Felfly H, Garcia D, Cloutier G, 2007. Characterization of circulatory disorders in beta-thalassemic mice by noninvasive ultrasound biomicroscopy. *Physiol Genomics* 29: 84–90.
5. McLellan SA, Walsh TS, 2004. Oxygen delivery and haemoglobin. Continuing Education in Anaesthesia. *Crit Care Pain* 4: 123–126.
6. Horne MK 3rd, 1981. Sickle cell anemia as a rheologic disease. *Am J Med* 70: 288–298.
7. Connes P, Lamarre Y, Waltz X, Ballas SK, Lemonne N, Etienne-Julan M, Hue O, Hardy-Dessources MD, Romana M, 2014. Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 165: 564–572.
8. Zwiebel WJ, Pellerito JS. Introduction to vascular ultrasonography. 5th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia; 2005.
9. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT, 2009. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol* 84: 618–625.
10. Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK, 2010. Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol* 85: 831–833.

11. Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, Osunkwo I, Wang WC, Hoppe C, Hagar W, Darbari DS, Malik P, 2012. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. *Scientific World Journal* 2012: 949535.
12. Zorca S, Freeman L, Hildesheim M, Allen D, Remaley AT, Taylor JG 6th, Kato GJ, 2010. Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *Br J Haematol* 149: 436–445.
13. Jones A, Granger S, Brambilla D, Gallagher D, Vichinsky E, Woods G, Berman B, Roach S, Nichols F, Adams RJ, 2005. Can peak systolic velocities be used for prediction of stroke in sickle cell anemia? *Pediatr Radiol* 35: 66–72.
14. Jager KA, Phillips DJ, Martin RL, Hanson C, Roederer GO, Langlois YE, Ricketts HJ, Strandness DE Jr, 1985. Noninvasive mapping of lower limb arterial lesions. *Ultrasound Med Biol* 11: 515–521.
15. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT, 2010. Sickle-cell disease. *Lancet* 376: 2018–2031

Table 1. Hemolysis laboratory markers and Doppler parameter of lower limbs arterial flow.

Parameters	Patients	Control Group	<i>p</i> -value
	Mean values (SD)	Mean values (SD)	
Age, years	14.3 (7.6)	16.4 (7.8)	0.205
Hb, g/dL	7.69 (1.18)	13.68 (1.27)	<0.0001
Ret, %	11.82 (5.29)	0.94 (0.46)	<0.0001
LDH, U/L	1406.23 (544.29)	385.43 (129.93)	<0.0001
T-Bil, mg/dL	4.46 (3.47)	0.42 (0.19)	<0.0001
I-Bil, mg/dL	3.74 (3.19)	0.28 (0.15)	<0.0001
Popliteal artery			
PSV, cm/s	104.2 (20.8)	73.1 (16.3)	<0.0001
Anterior tibial artery			
PSV, cm/s	80.5(25.0)	49.9 (12.4)	<0.0001
Posterior tibial artery			
PSV, cm/s	83.5(27.3)	51.4(17.6)	<0.0001

Note: *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Hb, hemoglobin; Ret, reticulocyte; LDH, lactate dehydrogenase; T-Bil, total bilirubin; I-Bil, indirect bilirubin; PSV, peak systolic velocity.

Table 2. Correlation of hemolysis markers with peak systolic velocity.

Markers	Popliteal artery		Anterior tibial artery		Posterior tibial artery	
	<i>r</i>	<i>p</i> -value	<i>r</i>	<i>p</i> -value	<i>r</i>	<i>p</i> -value
Hemoglobin	-0.61	<0.0001	-0.63	<0.0001	-0.68	<0.0001
Reticulocyte count	0.63	<0.0001	0.54	<0.0001	0.54	<0.0001
Lactate dehydrogenase	0.64	<0.0001	0.62	<0.0001	0.71	<0.0001
Indirect bilirubin	0.60	<0.0001	0.63	<0.0001	0.62	<0.0001
Total bilirubin	0.60	<0.0001	0.62	<0.0001	0.63	<0.0001

Note: *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

5.3 ARTIGO 3

DOPPLERVELOCIMETRIA ARTERIAL DAS ÓRBITAS
EM PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME:
RELAÇÃO COM BIOMARCADORES DE HEMÓLISE

Submetido ao periódico **Radiologia Brasileira** em 24/09/2015 sob o formato de *original article*.

Fator de impacto 2014: 0,598

Dopplervelocimetria arterial das órbitas em portadores de anemia falciforme: relação com
biomarcadores de hemólise

Orbital Doppler sonography in patients with sickle cell anemia: relationship with hemolysis
biomarkers

Thiago de Oliveira Ferrão¹, Paulo Ricardo Saquete Martins-Filho², Cleverton Canuto Aragão¹,
Marlyson Ronyere Neves Santana¹, Allan Ramon Santos Nascimento¹, Rosana Cipolotti¹, Thayane
Sobral Cardoso¹

1 Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

2 Laboratório de Patologia Investigativa, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

Running title: Doppler arterial das órbitas e hemólise na anemia falciforme

Autor Correspondente: Thiago de Oliveira Ferrão

Rua Anita Garibaldi, 550 – apto. 501 – Centro. Caçador-SC. CEP: 89500-000. Tel 55 (49) 9200-9965.

Email: ferroferrao@gmail.com

Resumo

Anemia falciforme (AF) é caracterizada pela produção de hemoglobina anormal que, no estado desoxigenado, deforma e enrijece hemácias, promovendo manifestações clínicas multissistêmicas. As afecções oculares mais significativas são agrupadas em retinopatias proliferativas e não proliferativas. Hemólise exerce papel essencial na patogênese da doença, por redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, com prejuízo à vasodilatação endotélio-dependente. A ultrassonografia Doppler permite avaliação não invasiva da resistência vascular orbitária, importante no estudo de doenças oculares. O objetivo deste trabalho foi investigar o estado de resistência arterial orbitária mediante dopplervelocimetria em portadores de AF e sua relação com biomarcadores de hemólise. Neste estudo transversal, dois grupos foram examinados: um com 71 portadores de AF; outro, controle, com 32 sujeitos saudáveis pareados por gênero e idade; ambos avaliados por meio de ultrassonografia e testes laboratoriais. Todos os marcadores laboratoriais foram anormais nos portadores de AF. Neste grupo, a dopplerfluxometria evidenciou velocidades alteradas e resistência vascular (IR e IP) elevada nas artérias oftálmica e central da retina. Nestes vasos, foi observada correlação significativa entre reticulócitos e hemoglobina com IR e IP. O estudo demonstrou que a resistência arterial das órbitas, aferida por dopplervelocimetria, é elevada em portadores de AF, com correlação significativa com biomarcadores de hemólise.

Abstract

Background. In the sickle cell anemia, abnormal deoxyhemoglobin deforms and stiffens red cells, leading to multisystem clinical manifestations, including retinopathy. Hemolysis plays significant role in disease pathogenesis, possibly via decreased bioavailability of nitric oxide, impairing endothelium-dependent vasodilatation. Doppler sonography enables non-invasive assessment of orbital vascular resistance, important for the evaluation of ocular diseases. *Objective.* The aim of this study was to investigate the state of orbital vascular resistance by means of Doppler sonography in steady state patients with sickle cell anemia, and its relationships with hemolysis biomarkers. *Materials and methods.* Two groups were examined in this cross-sectional study. One group consisted of 71 outpatients with sickle cell anemia; the control group consisted of 32 matched, healthy subjects. All participants were evaluated by means of orbital Doppler sonography and laboratory tests. *Results.* All laboratory markers were abnormal in the sickle cell anemia patients. Doppler sonography evaluation revealed changed flow velocities and high vascular resistance in the patients group, in the ophthalmic and central retinal arteries. Significant correlation was found between reticulocyte, hemoglobin and resistance indices. *Conclusion.* Orbital vascular resistance evaluated by means of Doppler sonography is elevated in steady state sickle cell anemia patients, and shows significant correlation with hemolysis biomarkers.

Palavras-chave Anemia Falciforme – Ultrassonografia Doppler de Pulso – Órbita – Hemólise – Marcadores Biológicos

Keywords sickle cell anemia – Doppler sonography – orbital – hemolysis biomarkers

Introdução

Anemia falciforme (AF), forma homozigótica da doença falciforme, é uma das hemoglobinopatias hereditárias mais comuns [1,2]. Estimativas mostram que 250 mil crianças nascem anualmente com AF em todo o mundo. Originária da África e trazida para a América pelo tráfico de escravos, é mais frequente onde a proporção de afrodescendentes é maior. Estima-se que aproximadamente 2.500 crianças nasçam por ano com AF no Brasil, onde a população não branca foi estimada em 50,74% pelo Censo 2010, e desta população não branca, cerca de 1% a 6% como portadores de AF [3].

A doença falciforme é caracterizada pela produção de hemoglobina anormal, conhecida como hemoglobina S. Eritrócitos “em foice” são formados durante a polimerização e precipitação intracelular de hemoglobina S no estado desoxigenado, resultando em rigidez celular que provoca diminuição do fluxo sanguíneo microvascular, com subsequente isquemia tecidual e infarto [4,5]. É reconhecido que a hemólise também exerce um papel significativo na patogênese da doença, possivelmente ao provocar redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais vasculares [6]. As manifestações clínicas dessa doença multissistêmica resultam da anemia hemolítica crônica e das consequências vaso-oclusivas das hemácias em foice, afetando quase todos os tecidos no corpo, incluindo os olhos.

As afecções oculares mais significativas ocorrem no fundo do olho, mais frequentes em portadores de hemoglobinopatia SC que nos portadores de AF [7], e podem ser agrupadas em alterações retinianas proliferativas e não proliferativas. Na retina, diversos processos patológicos (hipóxia, isquemia, neovascularização e fibrovascularização) podem resultar de oclusão microvascular secundária à AF. A formação de novos vasos é o fator precursor mais importante de complicações potencialmente amauróticas, precedendo o desenvolvimento de hemorragia vítrea ou descolamento de retina. As manifestações oculares podem ser assintomáticas, a despeito da progressão da doença, e pode ter consequências devastadoras [8].

A ultrassonografia com Doppler das órbitas permite a avaliação não invasiva da resistência vascular arterial através da medida dos índices de resistência (IR) e de pulsatilidade (IP), principalmente no estudo do fluxo sanguíneo em doenças oculares [9]. Estudos prévios descreveram os achados dopplerfluxométricos em artérias intracranianas, pulmonares, renais e periféricas em portadores de AF [4,10–14]. Entretanto, pelo que sabemos, pouco é conhecido sobre alterações vasculares orbitárias em portadores de AF, bem como suas relações com biomarcadores de hemólise. O objetivo deste estudo foi investigar o estado de resistência vascular arterial orbitária por meio de dopplervelocimetria em pacientes portadores de anemia falciforme, e sua relação com biomarcadores de hemólise.

Material e métodos

Delineamento

Estudo transversal analítico conduzido de setembro de 2012 a outubro de 2013, na Unidade de Diagnóstico por Imagem e no Ambulatório de Onco-hematologia Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

Tamanho amostral

A fórmula $n = (Z_{\alpha/2} * \sigma / E)^2$ foi adotada no cálculo do tamanho amostral (n), na qual $Z_{\alpha/2}$ representa o valor crítico Z para um intervalo de confiança de 95%; σ , o desvio-padrão na população; E, a margem de erro. Como o valor σ é desconhecido, foi substituído pelo desvio-padrão na amostra (s). Com base em estudo-piloto prévio com 39 pacientes, os valores $s = 13,05\text{cm/s}$ e $E = 3,0\text{ cm/s}$ foram calculados, e o valor $Z_{\alpha/2} = 1,96$ foi obtido a partir de tabela estatística, resultando numa amostra estimada de 73 pacientes.

Sujeitos

Dois grupos (total de 105 sujeitos) foram examinados. Um grupo formado por 73 pacientes com AF (padrão homozigoto SS confirmado por eletroforese de hemoglobina, 38 masculinos, faixa etária de 3 a 31 anos), acompanhados regularmente no ambulatório, compensados e sem história recente (por três meses) de crise dolorosa ou hemotransfusão. Definiu-se “compensado” como o paciente em estado basal sem dor aguda requerendo hospitalização. O outro grupo foi constituído por 32 controles aparentemente saudáveis, pareados por idade e gênero (16 masculinos, faixa etária de 3 a 27 anos) sem evidências na história clínica de alterações patológicas. Os controles foram recrutados por seleção aleatória de pacientes que se submeteram a exame ultrassonográfico de órgãos e sistemas não relacionados, atendidos rotineiramente na Unidade de Diagnóstico por Imagem. Nenhum dos grupos tinha sinais objetivos de envolvimento ocular. Todos os pacientes e controles assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da participação no estudo. Aprovação pelo comitê de ética institucional foi previamente obtido.

Protocolo ultrassonográfico

A avaliação ultrassonográfica foi realizada no equipamento Logiq P6 (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) com recursos de Doppler colorido e pulsado, com transdutor linear (11L) multifrequencial 3,4 a 10,8 MHz, de acordo com técnica já padronizada [15,16]. Os pacientes foram examinados em posição supina, mantendo o olhar fixo em direção anterior; com os olhos imóveis e fechados, o transdutor foi posicionado transversalmente na pálpebra superior, após a aplicação de uma gota de gel. O exame foi realizado sob condições confortáveis com técnica não compressiva, para evitar que a pressão do transdutor sobre a pálpebra interferisse nos resultados dopplervelocimétricos. As artérias oftálmica e central da retina foram identificadas com o auxílio do modo colorido, que facilitou o posicionamento do volume de amostra, ajustado entre 2mm a 4mm e no menor ângulo de insonação possível, para a medida das variáveis dopplerfluxométricas. Os parâmetros dopplervelocimétricos avaliados foram: velocidades de pico sistólico (VPS), diastólica final (VDF) e

média (VM), e os índices de resistência (IR) e de pulsatilidade (IP). Cada parâmetro foi medido somente quando pelo menos três ondas consecutivas com aparência similar foram observadas no modo espectral. As medidas foram obtidas com os recursos disponíveis nos aplicativos do equipamento. IR e IP foram calculados de modo convencional com as fórmulas: $IR = (VPS - VDF)/VPS$, e $IP = (VPS - VDF)/VM$. A média de três leituras de cada parâmetro de cada artéria de ambas as órbitas foi obtida e registrada para cada participante. A duração média do exame ultrassonográfico foi de 10 a 15 minutos por paciente, dependendo da cooperação dos sujeitos em não mover os olhos. Frequência cardíaca e pressão arterial foram aferidas antes do procedimento. Todos os participantes estavam normotensos no momento do exame. Pacientes dispneicos, com crise álgica, taquicardia ou doença hipertensiva conhecida foram excluídos do estudo. Todos os exames foram realizados pelo mesmo radiologista, experiente, cego para a alocação dos sujeitos.

Investigação laboratorial

Amostras de sangue foram obtidas dos participantes do estudo para realização de hemograma por processo automatizado (Labmax, Labtest, Minas Gerais, Brasil), para contagem de hemácias (Hm), nível de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem de reticulócitos (Ret). A investigação bioquímica foi realizada por análise automatizada (Cell-Dyn, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA), com a determinação dos níveis de bilirrubinas total e indireta e de desidrogenase láctica (LDH). Como marcadores de hemólise intravascular crônica [5], foram considerados Hb, Ret, LDH e bilirrubinas total e indireta.

Análise estatística

A distribuição dos grupos de pacientes e controles foi testada para normalidade dos dados (teste de D'Agostino-Pearson). Média e desvio-padrão foram calculados para idade, variáveis

laboratoriais e dopplerfluxométricas (VPS, VDF, VM, IR, IP). Para comparação entre os grupos, os valores p foram calculados pelo teste t não pareado ou pelo teste de Mann-Whitney. Para determinar a relação entre os marcadores laboratoriais de hemólise e os índices de resistência vascular (IR e IP), foi utilizada regressão linear múltipla. Teste de Spearman foi aplicado após a análise de regressão para medir a força de correlação das variáveis com significância estatística. A força de associação foi considerada, para valores absolutos de r_s , como segue: $0 \leq r_s < 0,2$ como muito fraca; $0,2 \leq r_s < 0,4$, fraca; $0,4 \leq r_s < 0,6$, moderada; $0,6 \leq r_s < 0,8$, forte; $0,8 \leq r_s < 1,0$, muito forte. Todos os testes estatísticos foram bicaudais, com valor $p < 0,05$ considerado significativo. A análise estatística foi conduzida com o auxílio do aplicativo BioStat versão 5.3 (AnalystSoft, Inc.).

Resultados

Do grupo de 73 portadores de AF, duas pacientes do gênero feminino foram excluídas por falta de cooperação. Não houve perda de seguimento dos demais participantes. A amostra final consistiu de 71 pacientes e de 32 controles.

Os grupos não diferiram quanto à idade e frequência cardíaca (tabela 1). Todos os marcadores laboratoriais foram anormais nos portadores de AF em comparação aos controles ($p < 0,0001$ para todas as comparações).

A avaliação dopplervelocimétrica evidenciou velocidades aumentadas na artéria oftálmica e reduzidas na artéria central da retina, bem como índices IR e IP elevados em ambas as artérias no grupo AF em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). A VPS da artéria central da retina, apesar de menor nos portadores de AF, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (tabela 2). Não houve diferenças dopplerfluxométricas entre os olhos de cada participante.

A análise por regressão linear múltipla da relação entre os marcadores de hemólise e os índices de resistência vascular mostrou associação significativa entre reticulócitos e IR e IP na artéria

oftálmica, e entre Hb e IR e IP na artéria central da retina (tabelas 3 e 4). LDH e bilirrubinas total e indireta não apresentaram associação significativa com os índices em nenhuma das artérias.

Devido aos achados significativos relacionando Ret e Hb a IR e IP, detectados por análise multivariada, o coeficiente de correlação linear de Spearman (r_s) foi calculado, e diagramas de dispersão com linha de ajuste para a análise bivariada foram gerados para ilustrar e quantificar essa relação em cada artéria. Moderada correlação direta ($0,4 \leq r_s < 0,6$) foi observada entre Ret e ambos os índices na artéria oftálmica (figura 1). Forte correlação inversa ($0,6 \leq r_s < 0,8$) foi detectada entre Hb e IR e IP na artéria central da retina.

Discussão

As complicações oftalmológicas da AF podem afetar a órbita, a conjuntiva, a câmara anterior e o segmento posterior. Na órbita, manifesta-se como síndrome de compressão orbital, causada por infarto do osso esfenóide com formação de hematoma subperiosteal e resposta inflamatória. Na conjuntiva, segmentos vasculares sofrem dilatação sacular transitória, com aspecto em “salsicha” ou “vírgula”, notadamente na porção bulbar inferior; o “sinal da vírgula” é mais comum na hemoglobinopatia SS que na forma SC. Proliferação endotelial, agregação de hemácias na porção distal dos capilares e dilatação e afilamento dos segmentos proximais dos vasos são os achados histopatológicos predominantes; baixos níveis de Hb e Ht predispõem a alterações conjuntivais [17].

Preenchida por humor aquoso, a câmara anterior é um ambiente com baixo pH e baixa concentração de oxigênio. Na vigência de hemorragia (hifema, do grego ὕφαμα, “sangrento”), eritrócitos e leucócitos consomem O_2 e liberam CO_2 e lactato, provocando acidose e falcização; as hemácias em foice obstruem a malha trabecular (responsável pela drenagem do humor aquoso), levando ao aumento da pressão intraocular: glaucoma agudo, uma emergência oftalmológica. No segmento posterior, as manifestações incluem: hemorragia e exsudato da retina, estrias angioides, infarto coriorretiniano, hemorragia vítrea, oclusão da artéria retiniana (central ou dos ramos) e

retinopatia proliferativa. Oclusão arteriolar e perda da perfusão capilar na periferia da retina são as características mais marcantes da retinopatia falciforme, mais frequente na hemoglobinopatia SC que na forma SS, com predomínio na região superotemporal; as áreas isquêmicas liberam substâncias que estimulam a angiogênese; e o remodelamento vascular inicial na junção entre a periferia não perfundida e a região central perfundida promove a formação de anastomoses arteriovenosas [8,17].

Nossos dados mostraram aumento das velocidades na artéria oftálmica e redução das velocidades na artéria central da retina, em concordância com Aikimbaev e colaboradores [15]. Evidenciamos elevada resistência ao fluxo em ambos os vasos; entretanto, Aikimbaev detectou aumento de IR e IP apenas na artéria central da retina, sem alterações significativas na artéria oftálmica; talvez o tamanho da amostra (de apenas 46 pacientes) tenha sido insuficiente para detectar diferenças estatisticamente significativas nos índices de resistência deste vaso. Tantawy e colaboradores [8] evidenciaram aumento das velocidades na artéria oftálmica em relação aos controles, mas sem significância estatística; estes autores utilizaram protocolo de Doppler transcraniano em suas mensurações, com transdutor padrão de 2,0 MHz, que apresenta menor resolução espacial em relação ao *probe* empregado em nosso trabalho (10,8 MHz). A maior resolução facilita o estudo de estruturas superficiais, com maiores nitidez e sensibilidade na avaliação dopplervelocimétrica; este fator pode ter contribuído para a detecção de significância estatística em nossa amostra.

Polska e colaboradores [18] afirmaram que o IR da artéria central da retina, medida por ultrassonografia Doppler, não corresponde à resistência vascular retiniana verdadeira (R), quando aferida por outra metodologia bem mais complexa (dopplervelocimetria laser, medida do diâmetro dos vasos por analisador Zeiss com videocâmera e *software* específico, e medida da pressão de perfusão ocular por tonometria de Goldmann). Após o uso de O₂ a 100% como agente vasoconstrictor retiniano, ambos IR e R evidenciaram o aumento na resistência vascular, mas o efeito detectado pelo IR foi menor. Em nosso estudo, utilizamos transdutores com frequência maior (10,8 MHz, frente aos 5,0 MHz de Polska) e equipamento com *software* mais avançado em relação ao que se dispunha há 13 anos, quando Polska publicou seus dados. O avanço tecnológico permitiu o aprimoramento das

ferramentas de diagnóstico por imagem em todas as áreas, incluindo a ultrassonografia Doppler, com aumento na acurácia das aferições. As medidas do IR hoje permitem melhor estimativa da resistência vascular retiniana que na década passada; ademais, seu uso é mais prático, disponível e reproduzível que a metodologia complexa proposta por Polska, a um custo muito menor e sem prejuízo à avaliação clínica do paciente.

O diâmetro médio da artéria oftálmica é de $1,43 \pm 0,26$ mm (1430 ± 260 μ m) [19], e da artéria central da retina é de 163 ± 17 μ m [20]; ou seja, o diâmetro da artéria central da retina é cerca de dez vezes menor que o diâmetro da artéria oftálmica. O efeito esperado da vasoconstrição na artéria oftálmica é de aumento da velocidade do fluxo, como ocorre em outras artérias na vigência de processo patológico que promova estreitamento luminal, a exemplo da estenose por placa ateromatosa nas artérias carótida interna, renal e femoral. Por outro lado, o efeito da vasoconstrição numa artéria de diâmetro muito pequeno, como a artéria central da retina, seria possivelmente de promover redução da velocidade de fluxo, considerando a ação vasoconstritora num lúmen já anatomicamente estreito, o que seria comparável a um efeito suboclusivo. Conforme a Lei de Poiseuille, o volume de fluxo num vaso é diretamente proporcional à quarta potência do raio desse vaso. A artéria central da retina, que possui raio dez vezes menor que a artéria oftálmica, teria um volume de fluxo dez mil vezes menor, comparado a este vaso; qualquer evento vasoconstritor, por mínimo que seja, teria repercussão hemodinamicamente significativa, o que justificaria o achado de redução das velocidades. Comportamento semelhante é observado nos diminutos vasos da conjuntiva bulbar, quando avaliadas por microscopia intravital assistida por computador (CAIM, método que estuda a microcirculação): na vigência de vasoconstrição, ocorre redução de velocidade de fluxo, em lugar de aumento [21].

Quanto aos biomarcadores de hemólise, nosso estudo evidenciou forte correlação inversa entre os níveis de Hb e os índices de resistência na artéria central da retina, e moderada correlação direta entre os níveis de Ret e IR e IP na artéria oftálmica. Aikimbaev e colaboradores [15] demonstraram forte associação entre níveis reduzidos de Hb e resistência vascular retiniana aumentada (risco relativo: 6,7; $p < 0,009$); contudo, não identificou relação estatisticamente significativa quanto aos níveis de Ret. Ainda, Cheung e colaboradores [21] não detectaram significância estatística na

associação entre os níveis de Hb e de Ret com as velocidades de fluxo na artéria cerebral média, mensuradas por meio de Doppler transcraniano, nem com as velocidades na microcirculação da conjuntiva bulbar, avaliada por CAIM. Nenhum destes trabalhos avaliou os outros dois marcadores de hemólise (LDH e bilirrubinas).

Estudos recentes classificaram as complicações clínicas da AF em dois subfenótipos distintos: vasculopatia/disfunção endotelial/hemólise (que inclui hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de membro inferior e acidente vascular encefálico, mais comum em pacientes que apresentam maiores taxas de hemólise intravascular); e viscosidade/vaso-oclusão (que compreende crise dolorosa vaso-oclusiva, síndrome torácica aguda e osteonecrose) [5,22,23]. A taxa de hemólise intravascular crônica pode ser estimada através de marcadores laboratoriais, assim caracterizados: baixos níveis de hemoglobina, altos níveis de LDH, altos níveis de bilirrubina e alta contagem de reticulócitos [1,5]. A literatura não menciona qual o subfenótipo a que a retinopatia falciforme pertence. Alguns indícios apontam para o primeiro subfenótipo: fibroproliferação vascular, que ocorre tanto na retinopatia proliferativa, quanto na hipertensão pulmonar (envolve depleção de NO e desvio do metabolismo da síntese de arginina e NO para síntese de prolina e colágeno) [8,17,22]; e correlação com biomarcadores laboratoriais de hemólise (Hb e Ret), caracterizada em nosso estudo. As manifestações vaso-oclusivas na conjuntiva bulbar e retina, contudo, sugerem o segundo subfenótipo [17,21]. Mais estudos são necessários para melhor entendimento, com a inclusão de dados de pesquisa molecular.

Foram limitações de nosso trabalho: não dispusemos de outro radiologista como observador, para análise de concordância e determinação do índice κ ; falta de avaliação oftalmológica para correlações com mais dados clínicos; a microcirculação retiniana não foi estudada pela indisponibilidade de ferramenta diagnóstica para tal.

Conclusão

O estudo demonstrou que a resistência vascular arterial das órbitas, aferida por meio de dopplervelocimetria, é elevada em portadores de AF, com moderada a forte correlação com os biomarcadores de hemólise.

Conflitos de Interesse

Não há conflitos de interesse neste artigo.

REFERÊNCIAS

1. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT (2008) Sick cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 44: 1506–1528. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.008.
2. Tharaux P-L (2011) Endothelin in renal injury due to sickle cell disease. *Contrib Nephrol* 172: 185–199. doi:10.1159/000328699.
3. Lervolino LG, Baldin PEA, Picado SM, Calil KB, Viel AA, et al. (2011) Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. *Rev Bras Hematol Hemoter* 33: 49–54. doi:10.5581/1516-8484.20110015.
4. Guvenc B, Aikimbaev K, Unsal C, Akgul E, Akgul AE, et al. (2005) Renal vascular resistance in sickle cell painful crisis. *Int J Hematol* 82: 127–131. doi:10.1532/IJH97.E0412.
5. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT (2009) Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol* 84: 618–625. doi:10.1002/ajh.21475.

6. Akinsheye I, Klings ES (2010) Sick cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. *J Cell Physiol* 224: 620–625. doi:10.1002/jcp.22195.
7. Clarke WN, Vomiero G, Leonard BC (2001) Bilateral simultaneous retinal arteriolar obstruction in a child with hemoglobin SS sickle cell disease. *J AAPOS* 5: 126–128. doi:10.1067/mpa.2001.113314.
8. Tantawy AAG, Andrawes NG, Adly AAM, El Kady BA, Shalash AS (2013) Retinal changes in children and adolescents with sickle cell disease attending a paediatric hospital in Cairo, Egypt: risk factors and relation to ophthalmic and cerebral blood flow. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107: 205–211. doi:10.1093/trstmh/trt008.
9. Kuzmić AC, Brkljacić B, Ivanković D, Galesić K (2000) Doppler sonographic renal resistance index in healthy children. *Eur Radiol* 10: 1644–1648.
10. Taori KB, Chaudhary RS, Attarde V, Dhakate S, Sheorain V, et al. (2008) Renal Doppler indices in sickle cell disease: early radiologic predictors of renovascular changes. *AJR Am J Roentgenol* 191: 239–242. doi:10.2214/AJR.07.3125.
11. Adams RJ (2005) TCD in sickle cell disease: an important and useful test. *Pediatr Radiol* 35: 229–234. doi:10.1007/s00247-005-1409-7.
12. Bernaudin F, Verlhac S, Coïc L, Lesprit E, Brugières P, et al. (2005) Long-term follow-up of pediatric sickle cell disease patients with abnormal high velocities on transcranial Doppler. *Pediatr Radiol* 35: 242–248. doi:10.1007/s00247-005-1419-5.
13. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, et al. (2004) Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* 350: 886–895. doi:10.1056/NEJMoa035477.

14. Zawar SD, Vyawahare MA, Nerkar M, Jawahirani AR (2005) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in sickle cell disease by Doppler ultrasonography. *J Assoc Physicians India* 53: 677–680.
15. Aikimbaev K, Guvenc B, Canataroglu A, Canataroglu H, Baslamisli F, et al. (2001) Value of duplex and color doppler ultrasonography in the evaluation of orbital vascular flow and resistance in sickle cell disease. *Am J Hematol* 67: 163–167. doi:10.1002/ajh.1100.
16. Diniz ALD, Moron AF, Santos MC dos, Sass N (2004) Dopplervelocimetria colorida dos vasos orbitais: técnica de exame e anatomia vascular normal. *Radiol Bras* 37: 287–290. doi:10.1590/S0100-39842004000400013.
17. Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, et al. (2012) Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. *ScientificWorldJournal* 2012: 949535. doi:10.1100/2012/949535.
18. Polska E, Kircher K, Ehrlich P, Vecsei P V, Schmetterer L (2001) RI in central retinal artery as assessed by CDI does not correspond to retinal vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1442–7.
19. Kocabiylki N, Yazar F, Ozan H (2009) The intraorbital course of ophthalmic artery and its relationship with the optic nerve. *Neuroanatomy* 8: 36–38.
20. Dorner GT, Polska E, Garhöfer G, Zawinka C, Frank B, et al. (2002) Calculation of the diameter of the central retinal artery from noninvasive measurements in humans. *Curr Eye Res* 25: 341–345.
21. Cheung AT, Harmatz P, Wun T, Chen PC, Larkin EC, et al. (2001) Correlation of abnormal intracranial vessel velocity, measured by transcranial Doppler ultrasonography, with abnormal conjunctival vessel velocity, measured by computer-assisted intravital microscopy, in sickle cell disease. *Blood* 97: 3401–3404.

22. Morris CR (2008) Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 177–185. doi:10.1182/asheducation-2008.1.177.
23. Zorca S, Freeman L, Hildesheim M, Allen D, Remaley AT, et al. (2010) Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *Br J Haematol* 149: 436–445. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08109.x.

Tabela 1. Características clínicas dos portadores de anemia falciforme e dos controles saudáveis.

Parâmetros	Pacientes	Grupo Controle	Valor <i>p</i>
	Média (desvio-padrão)	Média (desvio-padrão)	
Idade, anos	14.3 (7.6)	16.4 (7.8)	0.205
FC, bpm	79.9 (13.2)	74.7 (11.7)	0.060
Hb, g/dL	7.69 (1.18)	13.68 (1.27)	<0.0001
Ht, %	22.38 (3.55)	41.44 (3.30)	<0.0001
Hm, x10 ⁶ /μL	2.43 (0.37)	4.97 (0.43)	<0.0001
Ret, %	11.82 (5.29)	0.94 (0.46)	<0.0001
VCM, fL	91.17 (9.40)	76.75 (19.31)	<0.0001
HCM, pg	31.32 (3.50)	34.44 (18.68)	<0.0001
CHCM, g/dL	34.36 (1.57)	33.0 (1.36)	<0.0001
LDH, U/L	1406.23 (544.29)	385.43 (129.93)	<0.0001
BT, mg/dL	4.46 (3.47)	0.42 (0.19)	<0.0001
BI, mg/dL	3.74 (3.19)	0.28 (0.15)	<0.0001

Nota: valor *p* menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

FC, frequência cardíaca; Hb, hemoglobina; Ht, hematócrito; Hm, hemácias; Ret, reticulócitos; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; BT, bilirrubina total; BI, bilirrubina indireta; LDH, desidrogenase láctica.

Tabela 2. Parâmetros dopplervelocimétricos do fluxo vascular das órbitas.

Parâmetros	Pacientes	Grupo Controle	Valor <i>p</i>
	Média (desvio-padrão)	Média (desvio-padrão)	
Artéria oftálmica			
VPS, cm/s	32.9 (10.1)	24.0 (5.2)	<0.0001
VDF, cm/s	10.3 (3.4)	8.4 (1.8)	0.0002
VM, cm/s	17.9 (5.4)	13.6 (2.9)	<0.0001
IR	0.69 (0.05)	0.65 (0.03)	<0.0001
IP	1.28 (0.19)	1.15 (0.09)	<0.0001
Artéria central da retina			
VPS, cm/s	10.3 (1.9)	11.0 (2.1)	0.070
VDF, cm/s	3.3 (0.8)	4.4 (0.9)	<0.0001
VM, cm/s	5.6 (1.1)	6.6 (1.2)	0.0001
IR	0.68 (0.05)	0.59 (0.04)	<0.0001
IP	1.26 (0.15)	1.00 (0.10)	<0.0001

Nota: valor *p* menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

VPS, velocidade de pico sistólico; VDF, velocidade diastólica final; VM, velocidade média; IR, índice de resistência; IP, índice de pulsatilidade.

Tabela 3. Regressão linear múltipla dos efeitos dos marcadores de hemólise no índice de resistência das artérias oftálmica e central da retina.

Marcadores de hemólise	Artéria Oftálmica			Artéria Central da Retina		
	Coeficiente de regressão	T	Valor <i>p</i>	Coeficiente de regressão	T	Valor <i>p</i>
Hb, g/dL	0.0008	0.359	0.720	-0.0130	-5.524	<0.0001
Ret, %	0.0021	2.108	0.037	-0.0012	-1.143	0.255
LDH, U/L	0.0000	-1.078	0.284	0.0000	1.112	0.269
BT, mg/dL	0.0008	0.468	0.640	0.0029	1.668	0.098
BI, mg/dL	0.0042	0.704	0.483	0.0010	0.162	0.871

Nota: valor *p* menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

Hb, hemoglobina; Ret, reticulócito; LDH, desidrogenase láctica; BT, bilirrubina total; BI, bilirrubina indireta.

Tabela 4. Regressão linear múltipla dos efeitos dos marcadores de hemólise no índice de pulsatilidade das artérias oftálmica e central da retina.

Marcadores de hemólise	Artéria Oftálmica			Artéria Central da Retina		
	Coeficiente de regressão	T	Valor <i>p</i>	Coeficiente de regressão	T	Valor <i>p</i>
Hb, g/dL	0.0027	0.315	0.753	-0.0414	-5.610	<0.0001
Ret, %	0.0074	1.998	0.048	-0.0043	-1.329	0.186
LDH, U/L	-0.0001	-1.212	0.228	0.0001	1.026	0.307
BT, mg/dL	0.0026	0.414	0.679	0.0102	1.870	0.064
BI, mg/dL	0.0137	0.624	0.532	0.0023	0.121	0.903

Nota: valor *p* menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

Hb, hemoglobina; Ret, reticulócito; LDH, desidrogenase láctica; BT, bilirrubina total;
BI, bilirrubina indireta.

Fig. 1 Análise de correlação entre reticulócitos (Ret) e índices de resistência e pulsatilidade na artéria oftálmica. Moderada correlação direta foi observada entre Ret e índice de resistência (a), e entre Ret e índice de pulsatilidade (b).

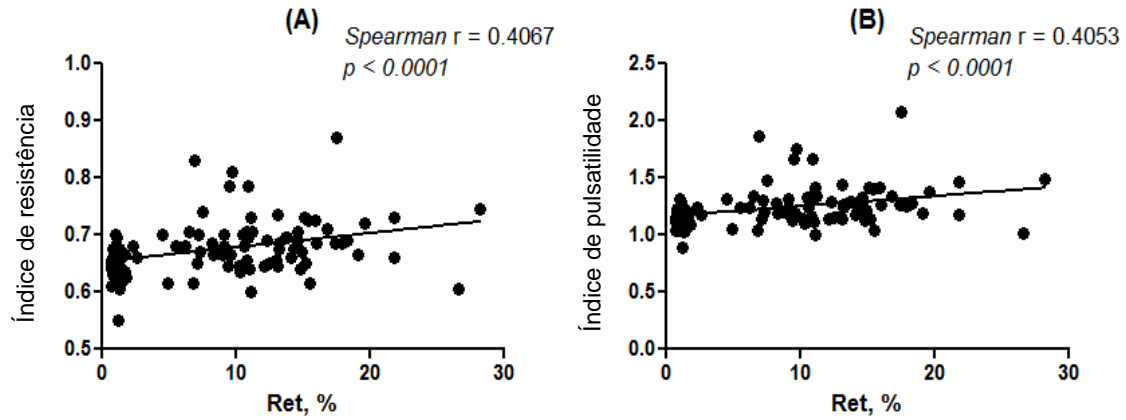
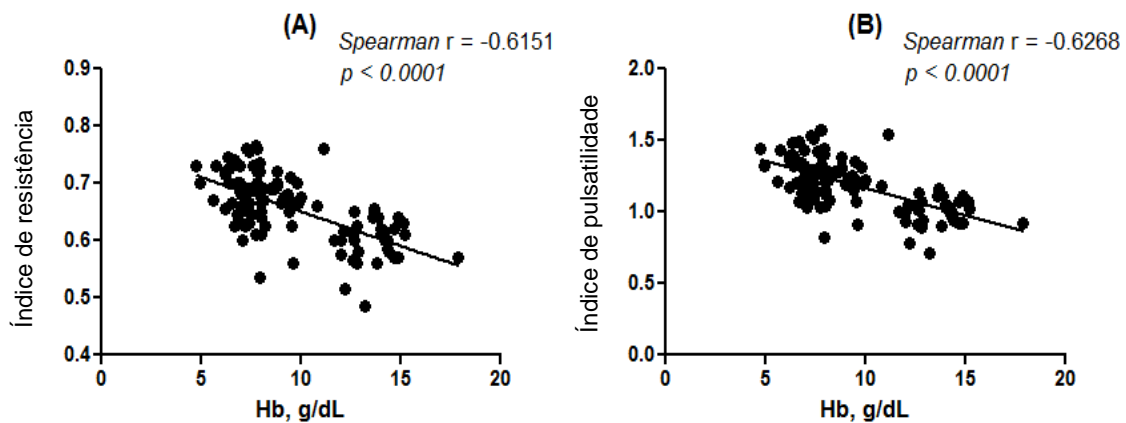


Fig. 2 Análise de correlação entre hemoglobina (Hb) e índices de resistência e pulsatilidade na artéria central da retina. Forte correlação inversa foi observada entre Hb e índice de resistência (a), e entre Hb e índice de pulsatilidade (b).



5.4 DISCUSSÃO GERAL

A intensidade da anemia hemolítica foi proposta como fator de risco independente para o desenvolvimento de certas complicações clínicas da anemia falciforme, como hipertensão arterial pulmonar e ulceração de membros inferiores; está associada significativamente a risco de mortalidade; e pode ser estimada a partir de marcadores laboratoriais: contagem de reticulócitos e dosagem sérica de desidrogenase láctica, hemoglobina e bilirrubinas (NOURAIE, 2013). Uma taxa hemolítica elevada apresenta correlação significativa com alta velocidade de regurgitação tricúspide, marcador ecodopplercardiográfico específico de hipertensão arterial pulmonar, condição de alta morbimortalidade nos portadores de anemia falciforme (GLADWIN, 2004).

O uso da ultrassonografia Doppler na avaliação da velocidade de fluxo e dos índices de resistência vascular arterial apresenta importância por caracterizar de forma não invasiva o estado hemodinâmico dos portadores de anemia falciforme, e pode ser utilizado na investigação de associações e correlações com marcadores de intensidade de hemólise.

Em nosso estudo, foi avaliado por dopplerfluxometria o leito arterial dos rins, dos membros inferiores e das órbitas, sítios que apresentam características hemodinâmicas distintas. Nos rins, a impedância vascular é normalmente baixa, com alta velocidade diastólica, representativa do compartimento visceral. Nos membros inferiores, a impedância é aumentada, com velocidade sistólica mais acentuada, fluxo reverso protodiastólico e velocidade diastólica muito reduzida, representativa do compartimento arterial periférico. Nas órbitas, temos duplo comportamento: o fluxo da artéria oftálmica é influenciado pela hemodinâmica central, com resistência moderada, enquanto o fluxo da artéria central da retina não depende de fatores sistêmicos e apresenta seu próprio mecanismo de autorregulação, com baixa impedância (ZWIEBEL, 2005; AIKIMBAEV, 2001). Considerando que o efeito hiperdinâmico da anemia crônica pode não ser homólogo em todas as artérias (TANTAWY, 2013), a avaliação independente dos três compartimentos vasculares fez-se necessária, detalhada nos três artigos que compõem este trabalho.

Nos três leitos arteriais analisados, foram evidenciados aumento da velocidade de fluxo e da resistência vascular, bem como correlação significativa com biomarcadores de hemólise, em concordância com diversos autores. Estes achados ratificam o caráter multissistêmico da anemia falciforme; reiteram a necessidade da abordagem multidisciplinar na assistência aos portadores; e corroboram o uso de marcadores dopplervelocimétricos e laboratoriais no acompanhamento dos pacientes.

Como perspectivas, pretendemos seguir a linha de pesquisa em anemia falciforme, com escopo em investigação diagnóstica e acompanhamento terapêutico, mediante o uso de métodos de imagem diversos (ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética); sua associação e/ou correlação com dados clínicos e laboratoriais; e com ênfase nas aplicações práticas na rotina ambulatorial, no manejo clínico de descompensações agudas e na melhoria da qualidade de vida dos portadores.

6 CONCLUSÃO

A resistência vascular arterial dos rins, membros inferiores e órbitas, aferida por meio de ultrassonografia Doppler, é elevada em jovens portadores de anemia falciforme, e apresenta correlação significativa com os biomarcadores de hemólise. Nos rins, forte correlação inversa foi observada entre nível de hemoglobina e os índices de resistência em todas as artérias; moderada correlação direta foi encontrada entre desidrogenase láctica e os índices de resistência nas artérias segmentares. Nos membros inferiores, moderada correlação direta foi detectada entre contagem de reticulócitos e velocidade de pico sistólico nas artérias tibial anterior e tibial posterior; forte correlação inversa foi observada entre hemoglobina e velocidade de pico sistólico em todas as artérias. Nas órbitas, moderada correlação direta foi encontrada entre contagem de reticulócitos e os índices de resistência na artéria oftálmica; e forte correlação inversa foi detectada entre hemoglobina e os referidos índices na artéria central da retina.

REFERÊNCIAS

AIKIMBAEV, K. S.; OĞUZ, M.; GÜVENÇ, B.; BAŞLAMIŞLI, F.; KOÇAK, R. Color Doppler ultrasonography of renal vascular resistance in sickle cell disease: clinical implications. **International Journal of Angiology**, v. 7, p. 144-146, 1998.

AIKIMBAEV, K.; GUVENC, B.; CANATAROGLU, A.; CANATAROGLU, H.; BASLAMISLI, F.; OGUZ, M. Value of duplex and color Doppler ultrasonography in the evaluation of orbital vascular flow and resistance in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 67, p. 163-167, 2001.

BITARÃES, E. L.; OLIVEIRA, B. M.; VIANA, M. B. Compliance with antibiotic prophylaxis in children with sickle cell anemia: a prospective study. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. 316-322, 2008.

CONNES, P.; LAMARRE, Y.; WALTZ, X.; BALLAS, S. K.; LEMONNE, N.; ETIENNE-JULAN, M.; HUE, O.; HARDY-DESSOURCES, M. D.; ROMANA, M. Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 165, p. 564-572, 2014.

DINIZ, A. L. D.; MORON, A. F.; SANTOS, M. C.; SASS, N. Dopplervelocimetria colorida dos vasos orbitais: técnica de exame e anatomia vascular normal. **Radiologia Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 287-290, 2004.

GLADWIN, M. T.; SACHDEV, V.; JISON, M. L.; SHIZUKUDA, Y.; PLEHN, J. F.; MINTER, K.; BROWN, B.; COLES, W. A.; NICHOLS, J. S.; ERNST, I.; HUNTER, L. A.; BLACKWELDER, W. C.; SCHECHTER, A. N.; RODGERS, G. P.; CASTRO, O.; OGNIBENE, F. P. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 886-895, 2004.

GUVENÇ, B.; AIKIMBAEV, K.; UNSAL, C.; AKGUL, E.; GURKAN, E.; BINOKAY, F.; BESEN, A. Renal vascular resistance in sickle cell painful crisis. **International Journal of Hematology**, v. 182, p. 127-131, 2005.

HOKAZONO, M.; SILVA, G. S.; SILVA, E. M. K.; BRAGA, J. A. P. Results from transcranial Doppler examination on children and adolescents with sickle cell disease and correlation between the time-averaged maximum mean velocity and hematological characteristics: a cross-sectional analytical study. **São Paulo Medical Journal**, v. 129, n. 3, p. 134-138, 2011.

HORNE III, M. K. Sick cell anemia as a rheologic disease. **American Journal of Medicine**, v. 70, p. 288-298, 1981.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37-47, 2007.

KATO, G. J.; HEBBEL, R. P.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine and new research directions. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 9, p. 618-625, 2009.

KATO, G. J.; HSIEH, M.; MACHADO, R.; TAYLOR VI, J.; LITTLE, J.; BUTMAN, J. A.; LEHKY, T.; TISDALE, J.; GLADWIN, M. T. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. **American Journal of Hematology**, v. 81, n. 7, p. 503-510, 2006.

KREJZA, J.; CHEN, R.; ROMANOWICZ, G.; KWIATKOWSKI, J. L.; ICHORD, R.; ARKUSZEWSKI, M.; ZIMMERMAN, R.; OHENE-FREMPONG, K.; DESIDERIO, L.; MELHEM, E. R. Sickle cell disease and transcranial Doppler imaging: inter-hemispheric differences in blood flow Doppler parameters. **Stroke**, v. 42, p. 81-86, 2011.

KUZMIĆ, A. C.; BRKLJAČIĆ, B.; IVANKOVIĆ, D.; GALEŠIĆ, K. Doppler sonographic renal resistance index in healthy children. **European Radiology**, v. 10, p. 1644-1648, 2000.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S.; PORTUGAL, R. D. Acute clinical events in patients with sickle cell disease: epidemiology and treatment. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, p. 95-100, 2008.

MCLELLAN, S. A.; WALSH, T. S. Oxygen delivery and haemoglobin. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain**, v. 4, p. 123-126, 2004.

MINNITI, C. P.; ECKMAN, J.; SEBASTIANI, P.; STEINBERG, M. H.; BALLAS, S. K. Leg ulcers in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 10, p. 831-833, 2010.

NOURAIE, M.; LEE, J. S.; ZHANG, Y.; KANIAS, T.; ZHAO, X.; XIONG, Z.; ORISS, T. B.; ZENG, Q.; KATO, G. J.; GIBBS, S. R.; HILDESHEIM, M. E.; SACHDEV, V.; BARST, R. J.; MACHADO, R. F.; HASSELL, K. L.; LITTLE, J. A.; SCHRAUFNAGEL, D. E.; KRISHNAMURTI, L.; NOVELLI, E.; GIRGIS, R. E.; MORRIS, C. R.; ROSENZWEIG, E. B.; BADESCH, D. B.; LANZKRON, S.; CASTRO, O. L.; GOLDSMITH, J. C.; GORDEUK, V. R.; GLADWIN, M. T. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. **Haematologica**, v. 98, n. 3, p. 464-472, 2013.

RUIZ, M. A. Anemia falciforme: objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.

TANTAWY, A. A. G.; ANDRAWES, N. G.; ADLY, A. A. M.; EL-KADY, B. A.; SHALASH, A. S. Retinal changes in children and adolescents with sickle cell disease attending a paediatric hospital in Cairo, Egypt: risk factors and relation to ophthalmic and cerebral blood flow. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, p. 205-211, 2013.

TAORI, K. B.; CHAUDHARY, R. S.; ATTARDE, V.; DHAKATE, S.; SHEORAIN, V.; NIMBALKAR, P.; WASNIK, P. N. Renal Doppler indices in sickle cell disease: early radiologic predictors of renovascular changes. **American Journal of Radiology**, v. 191, p. 239-242, 2008.

YANAGUIZAWA, M.; TABERNER, G. S.; CARDOSO, F. N. C.; NATOUR, J.; FERNANDES, A. R. C. Diagnóstico por imagem na avaliação da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 2, p. 102-105, 2008.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZAWAR, S. D.; VYAWAHARE, M. A.; NERKAR, M.; JAWAHIRANI, A. R. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in sickle cell disease by Doppler ultrasonography. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 53, p. 677-680, 2005.

ZWIEBEL, W. J.; PELLERITO, J. S. **Introduction to vascular ultrasonography**, 5th ed. Pennsylvania: Elsevier-Saunders, 2005, p. 611-636.

ANEXO - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O seguinte TCLE foi apresentado aos pais/responsáveis pelos pacientes com menos de 18 anos de idade, bem como dos pacientes que, com 18 anos ou mais, não tinham domínio completo da autonomia para decidir e autorizar a participação na pesquisa. Os pacientes com 18 anos ou mais, com pleno domínio de sua autonomia, apreciaram eles próprios o TCLE.

Prezado(a) paciente ou responsável pelo(a) paciente:

Nós somos médicos, estudantes de Medicina e pesquisadores da Universidade Federal de Sergipe, e estamos estudando há cerca de 15 anos os problemas que acontecem com as pessoas que tem Anemia Falciforme. Essa doença é genética (já se nasce com ela) e pode ser transmitida aos filhos, dependendo se ambos os pais (pai e mãe) possuem a doença ou a capacidade de transmiti-la (o que se chama “traço falciforme”).

As pessoas que tem Anemia Falciforme podem apresentar algumas complicações, muitas das quais os (as) senhores (as) já conhecem, como crises de dor, infecções, icterícia (olhos amarelados), anemia. Outras complicações não são facilmente percebidas, mas também representam problemas, como as alterações de crescimento, de chegada de sangue e oxigênio ao cérebro e aos ossos, e a hemossiderose (quantidade alta de ferro no corpo) por causa das transfusões de sangue.

Estamos iniciando um trabalho de pesquisa intitulado “Fluxo sanguíneo arterial renal, periférico e orbital em jovens portadores de anemia falciforme: associação com biomarcadores de hemólise” e estamos convidando você/ seu (sua) filho (a) para participar. A forma de participação é a seguinte: um estudante de Medicina que se identificará como participante da pesquisa apresentará este Termo de Consentimento, que será lido e, se você/o (a) senhor (a) estiver de acordo, assinará e ficará com uma cópia.

Em seguida, haverá uma entrevista a respeito das informações pessoais (nome, endereço, ocupação) e sobre a doença (principais sintomas, diagnóstico, tratamentos e complicações). Seu filho (a)/senhor (a) será submetido a um exame chamado ultrassonografia com Doppler (exame de imagem indolor no qual o paciente permanece deitado por determinado tempo enquanto o aparelho captura imagens dos órgãos internos), realizado pelo médico que participa da pesquisa. O exame físico e os exames de laboratório (hemograma,

bilirrubina total e frações, desidrogenase láctica), que serão solicitados, serão realizados em conjunto com os habitualmente utilizados para o acompanhamento de sua doença. Utilizaremos as informações obtidas desses exames para os estudos.

Lembramos que a participação nos estudos é livre e voluntária, e que nenhum problema acontecerá se você/o (a) senhor (a) não concordar em participar, estando seu atendimento garantido em qualquer circunstância. Entretanto, sua participação será de grande utilidade para aumentarmos nossos conhecimentos sobre a Anemia Falciforme e assim podermos tratar melhor seus portadores. Além disso, mesmo após concordar em participar, em qualquer momento você/o (a) senhor (a) poderá desistir sem que isso lhe cause qualquer transtorno ou constrangimento. Não haverá nenhum gasto a mais por conta da pesquisa, uma vez que todos os exames lhe serão gratuitos, e nenhum tipo de pagamento é feito.

Destacamos ainda que não haverá qualquer identificação individual, pois os nomes serão substituídos por um código de números e os resultados serão apresentados apenas em conjunto. Por outro lado, seus resultados individuais lhe serão fornecidos, e qualquer problema identificado através deles será tratado pela equipe médica do Hospital Universitário – UFS.

Contatos com os pesquisadores:

Dra Rosana: 9981-1238

Dra Simone: 9987- 4209

Dr. Thiago: 9900-4605